FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

826

ANNÉE 1968 N°

THÈSE

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

(Diplôme d'Etat)

par

PLOUSSARD Jean-Pierre,

Interne des Hôpitaux de Paris,

Né le 30 Août 1937, à Châlons-sur-Marne (Marne).

Présentée et soutenue publiquement le

LA CAPACITÉ RÉSIDUELLE DE FIXATION DE LA SÉRUM-ALBUMINE POUR LA BILIRUBINE. INTÉRÊT DE SON ÉTUDE DANS L'ICTÈRE DU NOUVEAU-NÉ.

Président : Mr. R. LAPLANE, Professeur.

DUPUYTREN-COPY

9, Rue Dupuytren

Paris (6e)

1968

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNÉE 1968 N°

THÈSE

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

(Diplôme d'Etat)

par

PLOUSSARD Jean-Pierre,

Interne des Hôpitaux de Paris,

Né le 30 Août 1937, à Châlons sur-Marne (Marne).

Présentée et soutenue publiquement le

LA CAPACITÉ RÉSIDUELLE DE FIXATION DE LA SÉRUM-ALBUMINE POUR LA BILIRUBINE. INTÉRÊT DE SON ÉTUDE DANS L'ICTÈRE DU NOUVEAU-NÉ.

Président : Mr. R. LAPLANE, Professeur.

DUPUYTREN-COPY

9, Rue Dupuytren

Paris (6e)

1968

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. ALAJOUANINE (T.), BENARD (H.), BERNARD (E.), BINET (L.), BULLIARD (H.), CATHALA (J.), CHABROL (E.), CHAILLEY-BERT (P.), CHEYMOL (J.), DEBRE (R.), FEY (B.), GALLIARD (H.), GAUDART D'ALLAINES (F. de), GENNES (L. de), GIROUD (A.), HAZARD (R.), HEUYER (G.), LAROCHE (G.), LAVIER (G.), LELONG (M.), LEVY (Mlle J.), LEVY-SOLAL (E.), LIAN (C.), MARCHAL (G.), MATHIEU (P.), MONOD (R.), MOREAU (R.), MOULONGUET (P.), PASTEUR VALLERY-RADOT, PETIT-DUTAILLIS (D.), PIEDELIEVRE (R.), QUENU (J.), RENARD (G.), SENEQUE (J.), STROHL (A.), TANON (L.), VERNE (J.).

DOYEN ..... Georges BROUET

1er ASSESSEUR : ..... Daniel BARGETON
2me ASSESSEUR : ..... Jean GOSSET

I.- PROFESSEURS

1°)- CHAIRES DE SCIENCES FONDAMENTALES

a)- Professeurs titulaires :

	MM.
Anatomie	DELMAS (A.)
-	HUARD (P.)
Anatomie et cytologie pathologiques	DELARUE (J.)
Anesthésiologie	VOURC'H (G.)
Bactériologie et virologie	TOURNIER (P.)
Biochimie médicale	JAYLE (M.-F.)
- -	POLONOVSKI (J.)
- -	DESGREZ (P.)
Biologie appliquée à l'Education physique et aux Sports	MALMEJAC (J.)
Biologie médicale	FAUVERT (R.)

MM.

Biophysique médicale	BUGNARD (L.)
- -	DOGNON (A.)
- -	DJOURNO (A.)
Cancérologie expérimentale	MATHÉ (G.)
Chimie pathologique	SCHAPIRA (G.)
Génétique fondamentale	LEJEUNE (J.)
Histoire de la médecine et de la chirurgie	COURY (Ch.)
Histologie et Embryologie	TUCHMANN-DUPLESSIS (H.)
- -	COUJARD (R.)
Hygiène et médecine préventive	BOYER (J.)
Médecine du Travail	DESOILLE (H.)
Médecine légale, Droit médical et déontologie	DEROBERT (L.)
Microbiologie (Bactériologie et virologie)	FASQUELLE (R.)
Parasitologie	N...
Pathologie chirurgicale	LAURENCE (G.)
- -	KUSS (R.)
- -	VERNE (J.-M.)
Pathologie exotique	BRUMPT (L.-C.)
Pathologie expérimentale et comparée	MERKLEN (F.-P.)
Pathologie médicale	LAROCHE (Cl.)
- -	BRICAIRE (H.)
- -	PEQUIGNOT (H.)
Pathologie respiratoire	TURIAF (J.)
Pathologie et thérapeutique générales	MAURICE (P.)
Pharmacologie	BOISSIER (J.-R.)
-	LECHAT (P.)
Physiologie	BARGETON (D.)
-	PARROT (J.)
Physiologie et pathologie obstétric.	LEPAGE (F.)
Radiologie médicale	DESGREZ (H.)
Technique chirurgicale et Chirurgie expérimentale	N...
Thérapeutique	LAMOTTE (M.)
Thérapeutique appliquée	N...

b)- Professeurs à titre personnel :

Anatomie	CABROL (Ch.)
Anatomie anthropologique	OLIVIER (G.)
Anatomie pathologique	NEZELOF (Ch.)

MM.

Bactériologie ..... BARBIER (P.)
Biochimie médicale ..... DREYFUS (J.-Cl.)
Biologie médicale ..... BOURLIERE (F.)
Parasitologie ..... LARIVIERE (M.)
Pathologie expérimentale ..... LOEPER (J.)
Physiologie ..... (DEJOURS (P.)
(SCHERRER (J.)
Physique médicale ..... (KELLERSHOHN (L.)
(GOUGEROT (L.)
(ROUCAYROL (J.-Cl.)
(TUBIANA (M.
Radiologie médicale ..... FISCHGOLD (H.)

2°)- CHAIRES DE SCIENCES CLINIQUES

a)- Professeurs titulaires :

MM.

Clinique carcinologique ..... DENOIX (P.)
Clinique carcinologique chirurgicale (Necker) ..... REDON (H.)
Clinique cardiologique (Broussais) ..... SOULIE (P.)
- -- (Boucicaut) ..... LENEGRE (J.)
Cliniques chirurgicales (Beaujon ..... LORTAT-JACOB (J.-L.)
(- ..... BAUMANN (J.)
(Cochin ..... LEGER (L.)
(Hôtel-Dieu ..... PATEL (J.)
(Saint-Antoine ..... GOSSET (J.)
(Salpêtrière ..... SICARD (A.)
(Tenon ..... OLIVIER (Cl.)
Clinique chirurgicale orthopédique et traumatologique (Cochin) ..... MERLE D'AUBIGNE (R.)
- - - (Foch) ..... PADOVANI (P.)
- - - (Beaujon) ..... CAUCHOIX (J.)
Clinique de chirurgie infantile et orthopédique (Enfants-Malades) ..... FEVRE (M.)
Clinique de chirurgie cardio-vasculaire (Broussais) ..... DUBOST (Ch.)
Clinique de chirurgie thoracique (Laënnec) ..... MATHEY (J.)
Clinique dermatologique (Saint-Louis) ..... DUPERRAT (F.)
Clinique endocrinologique (Pitié) ..... DECOURT (J.)

MM.

Clinique de Génétique médicale (Enfants-Malades) ..... LAMY (M.)
Clinique chirurgicale et gynécologique (Broca) ..... HUGUIER (J.)
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques (Saint-Louis) ..... DEGOS (R.)
Clinique des maladies des enfants (Enfants-Malades) ..... TURPIN (R.)
Clinique des maladies infectieuses (Claude-Bernard) ..... MOLLARET (P.)
Clinique des maladies mentales et de l'encéphale (Sainte-Anne) ..... DELAY (J.)
Clinique des maladies du sang (Broussais) ..... BERNARD (J.)
Clinique des maladies du système nerveux (Salpêtrière) ..... CASTAIGNE (P.)

Cliniques médicales
(Bicêtre ..... DEPARIS (M.)
(Broussais ..... MILLIEZ (P.)
(Cochin ..... N...
(Hôtel-Dieu ..... BARIETY (M.)
(Pitié ..... DREYFUS (G.)
(Saint-Antoine ..... CONTE (M.)
(Saint-Antoine ..... KOURILSKY (R.)
(Saint-Antoine ..... BOUDIN (G.)

Clinique d'hydrologie et de climatologie (Bichat) ..... DEBRAY (Ch.)
Clinique médicale infantile et pédiatrie sociale (Enfants-Malades) ..... MARIE (J.)
Clinique médicale propédeutique (Broussais) ..... JUSTIN-BESANÇON (L.)
Clinique médico-sociale du diabète sucré et des maladies métaboliques (Hôtel-Dieu) ..... DEROT (M.)
Clinique néphrologique (Necker) ..... HAMBURGER (J.)
Clinique de neuro-chirurgie (Pitié) ..... DAVID (M.)
Clinique neurologique (Salpêtrière) ..... GARCIN (R.)

Cliniques obstétricales
(Baudelocque ..... LACOMME (M.)
(Saint-Antoine ..... MERGER (R.)

Clinique obstétricale et gynécologique (Port-Royal) ..... VARANGOT (J.)
Clinique ophtalmologique (Hôtel-Dieu) ..... OFFRET (G.)
- - (Cochin) ..... BREGEAT (P.)
Clinique oto-rhino-laryngologique (Lariboisière) ..... AUBRY (M.)

MM.

Clinique de pédiatrie (Trousseau)..... MOZZICONACCI (P.)
Clinique de pédiatrie et de puériculture (Saint-Vincent-de-Paul)..... THIEFFRY (S.)
Clinique de pneumo-phtisiologie (Laënnec)..... BROUET (G.)
Clinique de neuro-psychiatrie infantile (Salpêtrière)..... MICHAUX (L.)
Clinique de rhumatologie médicale et sociale (Cochin)..... COSTE (F.)
Clinique de rhumatologie (Lariboisière)... SEZE (S. de)
Clinique stomatologique (Salpêtrière).. CERNEA (P.)
Clinique thérapeutique chirurgicale (Vaugirard)..... ROUX (M.)
Clinique thérapeutique médicale (Saint-Antoine)..... LEMAIRE (A.)
Clinique toxicologique (F. Widal)..... GAULTIER (M.)
Clinique traumatologique et orthopédique (R.-Poincaré)..... JUDET (R.)
Clinique urologique (Cochin)..... ABOULKER (P.)
- - (Necker)..... COUVELAIRE (R.)
Hygiène et clinique de la première enfance (Trousseau)..... LAPLANE (R.)
Séméiologie médicale (A. Chantin)..... DOMART (A.)
- - (Lariboisière)..... BOUVRAIN (Y.)
- - (Pitié)..... RAMBERT (P.)
- - (Rothschild)..... WOLFROMM (R.)
Séméiologie et clinique chirurgicale (Broussais)..... POILLEUX (F.)

b)- Professeurs à titre personnel :

Hématologie..... (ANDRE (R.)
(BOUSSER (J.)
Hydrologie et climatologie..... GIBERTON (A.)
Maladies infectieuses..... BASTIN (R.)
(AZERAD (E.)
(BOUR (H.)
(CAROLI (J.)
(DREYFUS (B.)
(GROSSIORD (A.)
Médecine..... (LAMBLING (A.)
(LAUNAY (Cl.)
(PAYET (M.)

MM.

Médecine	(PERRAULT (M.) (SIGUIER (F.) (WORMS (R.)
Néphrologie	RICHET (G.)
Neuro-chirurgie	LE BEAU (J.)
Neurologie	LHERMITTE (F.)
Neuro-psychiatrie	PICHOT (P.)
Oto-rhino-laryngologie	MADURO (R.)
Pédiatrie	(POLONOVSKI (Cl.) (ROYER (P.)
Pneumo-phtisiologie	(KREIS (B.) (MEYER (A.)
Rhumatologie	DELBARRE (F.)

II.- PROFESSEURS SANS CHAIRE

MM.

Anatomie pathologique	GOUYGOU (Ch.)
Bactériologie	CHRISTOL (D.)
Biochimie médicale	(CARTIER (P.) (GONNARD (P.) (NORDMANN (J.)
Biologie médicale	HARTMANN (L.)
Chirurgie	CERBONNET (G.)
Hématologie	BILSKI-PASQUIER (G.)
Maladies infectieuses	DUPONT (V.)
Neuro-psychiatrie	TARDIEU (G.)
Pédiatrie	ROSSIER (A.)
Physique médicale	(COURSAGET (J.) (GREMY (F.)
Physiologie	GIRARD (Fr.)
Stomatologie	CHAPUT (Mme A.)

III.- PROFESSEURS DETACHES DANS LES UNIVERSITES ETRANGERES

MM.

Bactériologie	HAUDUROY (P.) Pr.s.ch.
Pathologie chirurgicale	RUDLER (J.) Pr.s.ch.

IV.- PROFESSEURS ASSOCIES

Hormonologie	MORICARD (R.)
Statistique médicale et épidémiolog.	SCHWARTZ (D.)

MM

Secrétaire général de la Faculté ..... M. LENA (J.)

Conseiller administratif ..... Mlle CHAINTREUIL (C.)

Conservateur en Chef de la Bibliothèque)
Conservateur du Musée d'Histoire de la Médecine .....) M. le Docteur HAHN (A.)

Conservateurs .....) Mlles DUMAITRE (P.),
) LAURENT (H.), LE NOIR (G.)

Bibliothécaires .....) Mmes CONTET (J.), FORGET (F.),
) Mlles DUROZOY (M.-F.),
) ROBERGE (D.), Dr. SCHILLER (J.)

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A MA FEMME

A MON PÈRE, A MA MÈRE

A MA FILLE MARIELLE

A MES BEAUX-PARENTS

A MES FRÈRE ET SOEURS

A NOTRE MAÎTRE ET PRÉSIDENT DE THÈSE

Monsieur le Professeur R. LAPLANE

Professeur d'Hygiène et de Clinique
de la Première Enfance

Médecin de l'Hôpital Trousseau

Il nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de cette thèse, après nous avoir permis de bénéficier de son exceptionnel enseignement.

Qu'il trouve ici le témoignage de notre gratitude et de notre considération.

A NOTRE MAÎTRE,

le Docteur P. GRENET

Médecin de l'Hôpital Hérold

Il a bien voulu nous confier cette thèse.

Avec la plus grande bienveillance, il nous a guidé de ses conseils dans cette discipline pédiatrique qu'il a su nous faire aimer.

Qu'il soit assuré de notre sincère attachement et de notre respectueuse fidélité.

A Monsieur le Professeur Agrégé H. LESTRADET

Médecin des Hôpitaux

dont les précieux conseils nous ont servi de guide dans la réalisation d'un travail qu'il a inspiré.

En témoignage de notre profonde reconnaissance.

A NOS MAÎTRES DANS LES HÔPITAUX

Externat

Monsieur le Professeur Agrégé H. BROCARD

Monsieur le Professeur F. POILLEUX

Monsieur le Docteur M. BOLGERT

Monsieur le Professeur M. DEROT

Monsieur le Professeur Agrégé J. DI MATTEO

Monsieur le Professeur J. BOUSSER

Monsieur le Professeur Agrégé J. NICK

Monsieur le Professeur M. PERRAULT

Monsieur le Professeur M. LAMY

Internat

Monsieur le Docteur P. UHRY

Monsieur le Docteur J. WEILL

Monsieur le Docteur P. GRENET

Monsieur le Professeur Agrégé J. VIALATTE

Monsieur le Professeur R. BASTIN

Monsieur le Professeur R. LAPLANE

A Monsieur le Professeur Agrégé G. LASFARGUES

A l'enseignement brillant du conférencier des premières années, il a joint à notre égard la sollicitude du maître et de l'ami.

Qu'il en soit ici remercié.

A NOS AUTRES MAÎTRES DANS LES HÔPITAUX DE PARIS

Monsieur le Professeur D. CHRISTOL

Monsieur le Professeur Agrégé F. CONTAMIN

Monsieur le Professeur Agrégé F. DE PAILHERETS

Monsieur le Professeur Agrégé M. DUGAS

Monsieur le Professeur Agrégé J. FREZAL

Monsieur le Professeur Agrégé A. GUILLARD

Monsieur le Professeur Agrégé C. HOUDARD

Monsieur le Docteur C. LAPRESLE

Monsieur le Professeur Agrégé M. LEGRAIN

Monsieur le Professeur Agrégé J. PAUPE

Monsieur le Professeur C. POLONOVSKI

Monsieur le Professeur Agrégé J. REY

Monsieur le Docteur F. VERLIAC

Nous remercions ceux qui ont permis la réalisation de ce travail, particulièrement :

- le Professeur G. DAVID et le Docteur F. PINON

  qui nous ont ouvert les portes du Centre départemental de Transfusion ;

- Monsieur J. AGNERAY, Pharmacien de l'Hôpital Hérold,

  qui nous a accueilli dans son laboratoire ;

- Madame G. DURAND,

- Madame D. FEGER,

  pour leur collaboration efficace et souriante.

Nous n'oublions pas l'aide précieuse,

- des Internes en Pharmacie de l'Hôpital Hérold ;

- des Surveillantes, Infirmières et Secrétaires du Service du Docteur P. GRENET ;

- des Laborantines de la Pharmacie de l'Hôpital Hérold, et du Centre de Transfusion.

LA CAPACITÉ RÉSIDUELLE DE FIXATION DE LA SÉRUM-ALBUMINE POUR LA BILIRUBINE.

INTÉRÊT DE SON ÉTUDE DANS L'ICTÈRE DU NOUVEAU-NÉ.

INTRODUCTION

Si l'exsanguino-transfusion est une arme efficace dans la prévention de l'ictère nucléaire, complication redoutée des hyperbilirubinémies du nouveau-né, décider du moment opportun de son application est un acte difficile.

Le respect, dans ses indications, d'un niveau critique de la bilirubinémie, empiriquement fixé et souvent remis en question, apparaît insuffisant.

L'albumine du sérum, qui intervient dans la répartition de la bilirubine dans l'organisme, dispose vis-à-vis d'elle d'un "capital de fixation" qu'il paraît possible d'explorer par certaines méthodes.

Nous avons voulu étudier l'intérêt pratique d'une telle méthode de mesure de la capacité résiduelle de fixation de l'albumine pour la bilirubine, dans l'ictère du nouveau-né.

Nous avons adopté le plan suivant :

I- Métabolisme de la bilirubine.

A- Mécanisme de formation dans l'organisme.

B- Origines de la bilirubine dans l'organisme.

C- Transport plasmatique de la bilirubine libre.

D- Excrétion de la bilirubine.

II- Physiopathologie des ictères à bilirubine libre du nouveau-né et du prématuré.

A- Les étiologies des hyperbilirubinémies de la période néonatale.

B- Les dangers de l'hyperbilirubinémie.

C- Les mécanismes de survenue de l'ictère nucléaire.

1- Toxicité de la bilirubine libre.
2- Passage de la barrière hémo-cérébrale.
3- Notion de seuil critique de la bilirubinémie.

III- Le laboratoire et la bilirubine.

A- Le dosage de la bilirubine en pratique courante.

B- Les conséquences des difficultés techniques.

IV- Intérêt théorique d'une méthode de dosage de la capacité de fixation de la bilirubine par la sérum-albumine.

A- Les propriétés de la liaison plasmatique albumine-bilirubine.

B- Intérêt d'une méthode de dosage de la capacité résiduelle de fixation de la sérum-albumine pour la bilirubine.

V- Notre étude.

A- Matériel.

B- Méthodes.

C- Résultats.

D- Commentaires.

- I -

LE METABOLISME DE LA BILIRUBINE

A - LES MECANISMES DE FORMATION DE LA BILIRUBINE DANS L'ORGANISME.

1 - On sait, depuis très longtemps, que la bilirubine provient de la transformation de la protoporphyrine hémoglobinique.

Dans l'organisme humain, cette transformation s'effectue au niveau des cellules du système réticulo-endothélial, principalement dans le foie (215).

L'hémoglobine, rappelons-le, est constituée d'une protéine, la globine, et de quatre molécules d'hème ; celui-ci est lui-même constitué par l'association d'une porphyrine, la protoporphyrine 9 de type III, avec un atome de Fer ferreux.

Hémoglobine et bilirubine ont des formules chimiques très voisines. Toutes deux sont des dérivés tétrapyrroliques possédant les mêmes chaînes latérales. La différence essentielle entre les deux réside dans les caractères du noyau tétrapyrrolique : il s'agit d'un cycle fermé dans l'hémoglobine, d'une chaîne ouverte linéaire dans la bilirubine.

2 - Ainsi, le phénomène chimique principal de la formation de la bilirubine est-il l'ouverture du noyau tétrapyrrolique. D'autres étapes mènent

ensuite à la formation de la bilirubine. La conception classique (LEMBERG, 1936) y voyait des réactions non enzymatiques. Or, il semble, dans l'état actuel des connaissances, qu'interviennent au moins trois enzymes ou systèmes d'enzymes (194, 195, 248).

a)- La première étape, l'ouverture du noyau tétrapyrrolique, consiste en la rupture du pont méthénique α de la protoporphyrine. Elle est sous la dépendance de l'hème α méthémyloxygénase et conduit à la formation d'un pigment vert intermédiaire que caractérise sa bande d'absorption à 656 mμ (194).

La présence de la globine n'est pas indispensable dans cette transformation, contrairement à ce qu'avait pensé LEMBERG ; celle-ci peut s'effectuer, semble-t-il, aussi bien à partir de la molécule entière, que de groupement prosthétique isolé (110).

Par contre, la présence de l'ion ferreux est nécessaire ; la première étape semble être le passage du fer hémoglobinique de l'état bivalent à l'état trivalent (110, 186).

b)- La deuxième étape est la transformation du pigment vert intermédiaire, par action de l'hème α méthénylformylase en biliverdine avec libération de fer. Elle ferait intervenir un facteur plasmatique qui serait l'haptoglobine. L'enzyme agirait, en effet, sur le complexe hémoglobine-haptoglobine (194, 195).

c)- La troisième étape consiste en la réduction de la biliverdine formée en bilirubine, grâce à une enzyme spécifique, la bilirubine-réductase (248).

Ainsi, la formation du pigment biliaire principal, la bilirubine, à partir de l'hémoglobine, s'effectue en trois étapes successives, dans lesquelles interviennent trois enzymes, qu'on trouve principalement dans le foie, à qui paraît ainsi dévolue une place éminente dans la bilirubinogénèse.

La bilirubine, formée dans le système réticulo-endothélial, est libérée dans le plasma. C'est la bilirubine libre ou bilirubine non conjuguée.

B - LES ORIGINES DE LA BILIRUBINE DANS L'ORGANISME.

1 - Il est admis, depuis fort longtemps, que la bilirubine naît de la dégradation de l'hémoglobine circulante. L'hémoglobine ainsi transformée provient de la destruction des globules rouges circulants dont la durée de vie moyenne est de 100 à 130 jours (192, 215 bis).

2 - Récemment, on a pu montrer que cette voie métabolique n'était pas la seule et qu'il existait une autre source de pigment biliaire.

L'administration de précurseurs marqués (glycocolle, acide δ amino-lévulinique) de l'hème (138, 168, 222, 285) a montré que la bilirubine pouvait être formée dans le foie, par un mécanisme autre que la dégradation de l'hémoglobine, et en l'absence de toute hémolyse.

Ce mécanisme de production est à l'origine d'une fraction "précoce" de la stercobiline excrétée, dont le pourcentage irait de 15 à 20 % chez des sujets normaux à des chiffres beaucoup plus élevés de 40 à 85 % dans des conditions pathologiques.

Si le siège hépatique de cette bilirubinogénèse paraît prouvé, on ne sait pas, par contre, si elle se fait à partir de l'hème non hémoglobinique, exclusivement ou parallèlement à d'autres sources que l'hème. Il est possible que les systèmes enzymatiques hépatiques précédemment décrits interviennent dans la bilirubinogénèse précoce d'origine héminique.

C - LE TRANSFERT PLASMATIQUE DE LA BILIRUBINE LIBRE.

La bilirubine libre, ou bilirubine non conjuguée, est un pigment dont le spectre d'absorption, situé dans les radiations jaunes du visible, offre deux maximums, l'un à 410-420 mu, l'autre à 450-460 mμ (66). Elle peut être obtenue sous forme cristallisée.

La propriété essentielle de ce pigment est son caractère insoluble dans l'eau. Il est, par contre, soluble dans les lipides et les solvants organiques.

Dans le plasma sanguin, elle est également insoluble aux conditions habituelles de pH. Elle y est maintenue en solution, grâce aux liaisons qu'elle contracte avec l'albumine du sérum.

La réalité de ce transport plasmatique de la bilirubine libre par l'albumine du sérum a été démontrée (178, 190, 215). Dans des conditions physiologiques, seule l'albumine intervient dans ce transport. Ce n'est qu'à des concentrations supérieures à 200 mg/100 ml, très éloignées de celles qu'on peut rencontrer en pathologie humaine, qu'intervient la fixation de la bilirubine sur d'autres protéines du sérum : α_1 globuline, α_2 globuline ou β globuline (66, 190, 206).

Il est admis qu'un gramme d'albumine dissoute dans un tampon phosphate fixe environ 16 mg de bilirubine (1 molécule d'albumine fixe environ 2 molécules de bilirubine à pH 7,4). Ce rôle d'accepteur, l'albumine le joue probablement vis-à-vis de la bilirubine, de la même façon qu'elle le fait vis-à-vis d'autres ions organiques (178, 207). Ceci aura une importance particulière.

La capacité de fixation de la bilirubine par l'albumine n'atteint cette valeur théorique maximale que dans les conditions déterminées au laboratoire. Dans les conditions physiologiques, sa valeur dépend de nombreux facteurs. La concentration de l'albumine, les conditions de pH, la présence de certaines subs-

tances d'origine endogène et exogène tiennent sous leur dépendance la quantité de bilirubine libre qui peut être fixée. Nous y reviendrons plus loin, mais disons dès maintenant que l'abaissement du pH diminue les sites disponibles, que certains constituants présents dans le plasma, comme l'hématine, les acides gras non estérifiés (NEFA) ou certaines drogues qu'on y introduit, déplacent la bilirubine en raison de leur affinité plus grande pour les mêmes sites de fixation (9, 10, 13, 31, 147, 182, 207, 208, 240).

D - L'EXCRETION DE LA BILIRUBINE.

1 - La bilirubine libre n'est pas la seule forme de bilirubine existant dans l'organisme. Elle est dite libre, par opposition à la bilirubine glycuroconjuguée (71, 235), née de la conjugaison de la première, principalement dans le foie, et qui représente la forme d'épuration des pigments biliaires.

2 - On peut distinguer trois étapes dans le métabolisme hépatique de la bilirubine.

a)- La première est représentée par le passage de la bilirubine du plasma dans l'hépatocyte.

Le mécanisme de cette extraction de la bilirubine libre de plasma sanguin par le foie n'est pas entièrement éclairci. Il semble cependant qu'on doive écarter l'hypothèse du passage dans l'hépatocyte du complexe sérum-albumine - bilirubine, l'extraction de la bilirubine du complexe et le retour de la protéine dans le milieu extracellulaire. BROWN, GRODSKY et CARBONE (62) ont montré que ce transfert était trop rapide pour qu'il soit lié au passage d'une grosse molécule comme l'albumine. Pour BERNSTEIN (31), la dissociation se fait au niveau de la membrane de l'hépatocyte, prise dans le milieu intracellulaire ; la bilirubine libre est liée à une protéine ou une lipoprotéine différente de l'albumine, qui jouerait le rôle d'accepteur. D'autres constata-

tions faites au niveau du placenta chez le foetus (232) plaident, elles aussi, en faveur d'une dissociation de la bilirubine et de son support. Le transfert de la bilirubine libre dans le foie serait un transfert actif (33), nécessitant l'intégrité du pôle vasculaire de l'hépatocyte (149, 247). Peut-être franchit-elle la membrane grâce à son affinité pour les lipides (215) ?

b)- La deuxième étape réside en la transformation par l'hépatocyte de la bilirubine libre en bilirubine conjuguée : c'est la glycuro-conjugaison.

1)- C'est en 1954 que COLE, LATHE et BILLING (71) ont pu, par chromatographie, séparer, à partir de sérums et d'urines ictériques, deux fractions bilirubiniques :

- la fraction à mobilité lente (A), insoluble dans l'eau, était soluble dans le chloroforme ;
- la fraction à mobilité rapide (B), soluble dans l'eau, était insoluble dans le chloroforme.

2)- SCHMID, en 1956 (234), étudiant les azodérivés des fractions bilirubiniques isolées, a établi que l'azopigment A correspondait à la bilirubine libre (bilirubine indirecte de la réaction Hijmans Van den Bergh), et l'azopigment B à un dérivé glycuroconjugué de ce pigment biliaire, bilirubine conjuguée (bilirubine directe de la réaction de Hijmans Van den Bergh).

3)- D'autres travaux (17, 238) ont montré que la glycuro-conjugaison de la bilirubine se faisait suivant un mécanisme de transfert de l'acide glycuronique très comparable à celui antérieurement décrit pour d'autres corps chimiques (Phénol, corticostéroïdes).

Deux molécules d'acide glycuronique se fixent sur le groupement carboxyle de chacun des deux radicaux propioniques de la bilirubine, qui

est ainsi transformée en un ester glycuronique, le diglycuronide de bilirubine.

Le transfert de l'acide glycuronique sur la molécule de bilirubine est catalysé par une enzyme, le glycuronyl transférase, à partir de l'acide uridine-diphosphate-glycuronique (UDPGA). Ce dernier provient de l'oxydation en présence de DPN de l'uridine-diphosphate de glucose, lui-même né de l'action de l'uridine triphosphate sur le glucose 1 phosphate en présence d'uridyltransférase (FIGURE 1).

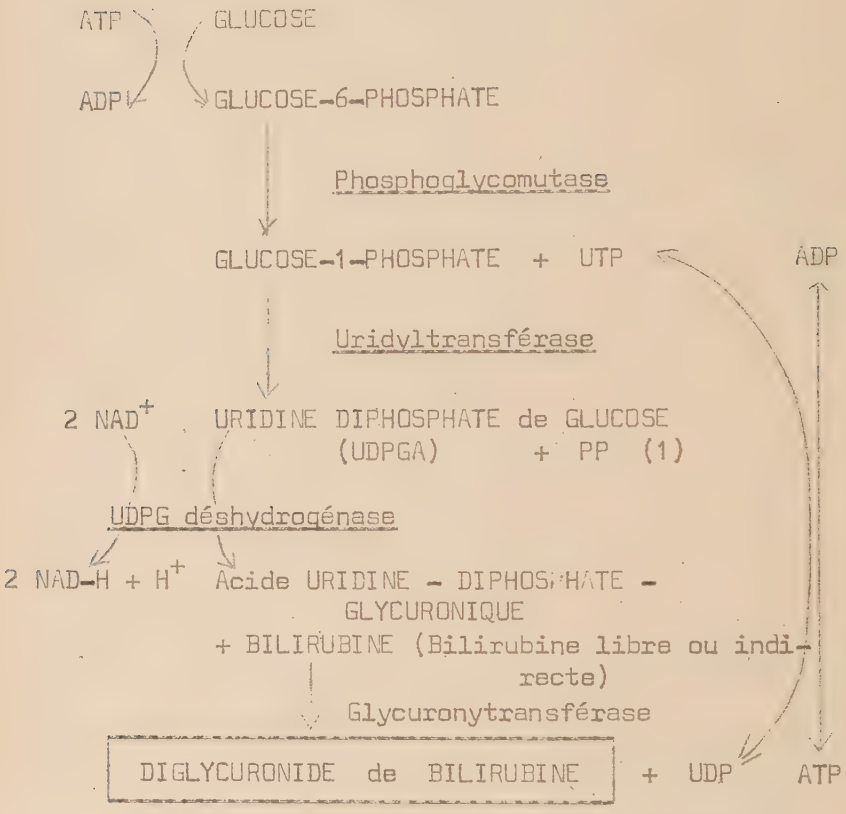
Une enzyme, la β glycuronidase, est capable de libérer la bilirubine libre de cette combinaison.

4)- La glycuro-conjugaison de la bilirubine libre est un mécanisme répandu chez les mammifères, puisqu'on l'a mis en évidence chez l'homme, le chien, le chat, le cobaye, le rat, le singe.

Le tissu hépatique n'est pas le seul capable d'effectuer cette conjugaison. Le tissu rénal, la muqueuse intestinale auraient une activité non négligeable in vitro. In vivo, la réalité de cette activité est discutée et paraît, dans les conditions normales de fonctionnement du foie, pour le moins négligeable. Par contre, les capacités de glycuro-conjugaison du tissu cérébral, de la rate, des muscles, du sang, sont nulles ou négligeables.

Dans le tissu hépatique, la glycuronyl-transférase est localisée aux microsomes et à la fraction lisse du cytoplasme réticulaire (9, 17, 59, 238). Le marquage isotopique des différentes fractions d'ultracentrifugation de tissu hépatique par la bilirubine libre et conjuguée (31, 62) n'a pas permis, jusqu'à présent, la mise en évidence d'un déroulement séquentiel des opérations à travers une chaîne de particules subcellulaires (62). Pour certains, ce qu'on appelle glycuronyl-transférase pourrait être un accepteur de la bilirubine qui permettrait un transfert du cytoplasme au réticulum

endoplasmique, où se ferait la glycuro-conjugaison (31).



(bilirubine conjuguée, bilirubine directe)

F I G U R E 1

(1)- Pyrophosphate.

L'absence d'un système hépatique de glycuro-conjugaison de la bilirubine (déficit en glycuronyl-transférase) est connue chez l'homme (maladie de Criggler-Najjar - certains ictères acholuriques familiaux). Chez l'animal, de nombreuses études sur le métabolisme de la bilirubine ont mis à profit l'existence d'une souche mutante de rats Wistar, décrite en 1938 par un généticien canadien, GUNN, et chez qui existe une déficience en glycuronyl-transférase (9, 10, 16, 31, 62, 147, 239).

La bilirubine glycuro-conjuguée, insoluble dans les lipides, est soluble dans l'eau et dans les solvants aqueux.

Dans le plasma, en dépit de ce caractère hydrosoluble, la bilirubine conjuguée, comme la bilirubine libre, est liée à l'albumine.

La liaison ester - acide glycuronique - bilirubine est rompue en milieu légèrement alcalin, exception faite d'une proportion variable du pigment contenu dans la bile fraîchement recueillie, qui est alcalino-résistante (35). Ce fait suggère la présence, à côté de la bilirubine glycuro-conjuguée, d'autres dérivés.

Certaines observations plaident en faveur de l'existence de dérivés sulfo-conjugués, mais l'accord n'est pas fait à ce sujet. On a signalé également la possibilité de conjugaison de la bilirubine avec le glycocolle (111, 186). Il ne semble pas exister d'éléments plaidant en faveur d'une compensation par ces mécanismes, en cas de déficience de la glycuro-conjugaison (33).

c)- La troisième étape de l'excrétion de la bilirubine est représentée par l'élimination des dérivés conjugués.

Cette excrétion est rendue possible par le caractère hydrosoluble de la bilirubine conjuguée. En effet, en l'absence de conjugaison, la

bilirubine libre n'est excrétée ni par la bile, ni par les urines.

De fait, en cas d'augmentation du taux sanguin de la bilirubine directe (ictères par hémolyse, déficit en glycuronyl-transférase), même très importante, celle-ci n'est jamais éliminée dans les urines.

Par contre, la bilirubine conjuguée, dès qu'elle apparaît dans le plasma, peut être éliminée dans les urines. Cet émonctoire n'est utilisé qu'exceptionnellement (ictère par obstruction, par hépatite), car, dans les conditions normales de fonctionnement hépato-biliaire, la bilirubine conjuguée est éliminée dès sa formation dans la bile.

La bile contient environ 85 % de pigment biliaire sous forme de bilirubine conjuguée. Le mécanisme intime de cette excrétion reste assez mystérieux. Il a pour point de départ l'hépatocyte ; mais la conception qui tendait à faire jouer aux lysosomes (116) un rôle d'excrétion comparable à celui qu'ils possèdent dans d'autres circonstances (90) semble démentie par des travaux récents (31).

Certains ictères chroniques congénitaux non hémolytiques (ROTOR, 1948 ; DUBIN-JOHNSON, 1953), où l'hyperbilirubinémie est de type direct ou mixte, semblent en rapport, non pas avec un trouble de la glycuro-conjugaison, mais avec un trouble du mécanisme d'excrétion de la bilirubine, peut-être par altération du pôle biliaire de l'hépatocyte.

Au terme de cette étude sur le métabolisme de la bilirubine, nous insisterons sur certains points :

- La bilirubine libre ne provient peut-être pas uniquement, comme il est classique de le dire, de la dégradation de l'hémoglobine des globules rouges circulants.

- Le caractère liposoluble de la bilirubine libre rend compte, d'une part de la nécessité d'une liaison avec une protéine sérique - la sérum albumine - pour son transport plasmatique ; d'autre part, de l'impossibilité de son excrétion par les deux grands émonctoires - foie, rein - en l'absence d'une transformation. Celle-ci, la glycuro-conjugaison, aboutit à un dérivé conjugué hydrosoluble qui est un diglycuronide de bilirubine.

- L'excrétion de la bilirubine implique de nombreuses opérations dont les principales commencent à être bien connues, si le mécanisme intime de la plupart reste encore obscur.

Ce sont essentiellement :

. Le transfert de la bilirubine libre du plasma dans l'hépatocyte à travers la membrane cellulaire du pôle vasculaire.

. La glycuro-conjugaison, qui fait intervenir des phénomènes complexes au niveau de l'hépatocyte. Un système enzymatique, la glycuronyl-transférase, y jouerait un rôle éminent.

. L'excrétion biliaire de la bilirubine conjuguée à travers le pôle biliaire de l'hépatocyte.

- II -

PHYSIOPATHOLOGIE DES ICTÈRES A BILIRUBINE LIBRE DU NOUVEAU-NÉ A TERME ET DU PRÉMATURÉ

Nous envisageons, dans une première partie, les principales étiologies des hyperbilirubinémies de la période néonatale, en insistant plus particulièrement sur l'une d'elles, l'ictère par "immaturité hépatique" du prématuré, réservant à un deuxième chapitre l'étude des dangers de ces ictères.

A - LES ÉTIOLOGIES DES HYPERBILIRUBINÉMIES DE LA PÉRIODE NÉONATALE.

1)- On pourrait distinguer très schématiquement, en fonction de leur mécanisme de survenue, deux grandes catégories d'hyperbilirubinémies :

a)- Les hyperbilirubinémies dues à un excès de production de bilirubine libre.

b)- Les hyperbilirubinémies dues à un trouble de la conjugaison de la bilirubine.

Dans les faits, cette distinction est trop schématique. Les deux mécanismes sont fort souvent associés. De plus, certaines formes particulières d'ictère à bilirubine libre de la période néonatale ne paraissent pas procéder de l'un ou de l'autre.

Aussi envisagerons-nous successivement :

. Les anémies hémolytiques néonatales,

. Les ictères néonataux non hémolytiques.

2)- Les anémies hémolytiques néonatales.

a)- La mieux connue, la plus fréquente, est la maladie hémolytique néonatale par incompatibilité foeto-maternelle dans le système Rh.

1°- Son mécanisme est bien connu (46, 49, 131, 188, 262, 263).

L'immunisation de la mère est due au passage dans la circulation maternelle de globules rouges foetaux, au moment de l'accouchement d'une première grossesse hétérologue.

Les anticorps maternels traversent le placenta et détruisent les globules rouges du foetus à partir du cinquième mois de la vie intra-utérine.

2°- Des aspects cliniques de la maladie, nous retiendrons l'importance de l'association à l'hémolyse d'une anémie. La précocité et le caractère menaçant de l'hyperbilirubinémie, le danger d'un ictère nucléaire, la gravité fréquente de l'anémie associée justifient l'attitude actuelle : dépistage et surveillance de toute grossesse hétéro-spécifique ; induction prématurée de l'accouchement, si celle-ci s'avère nécessaire ; exsanguino-transfusion, traitement de choix permettant de réparer l'anémie, d'extraire une partie de la bilirubine en excès et d'éviter ainsi le risque majeur de l'ictère nucléaire.

Rappelons que c'est dans la maladie hémolytique néonatale que le taux critique, le "seuil" de bilirubinémie acceptable, a été fixé. Le chiffre de 200 mg/l, couramment accepté (131, 175, 189), est celui au-dessus duquel le risque de voir survenir un

ictère nucléaire croît. Nous verrons plus loin ce qu'il faut en penser, mais soulignons dès maintenant que, dans la maladie hémolytique néonatale, la nécessité d'une exsanguino-transfusion est liée au double impératif de l'anémie hémolytique et de l'hyperbilirubinémie, la première pérennisant la seconde, et non conditionnée par celle-ci seule.

Les espoirs thérapeutiques portent moins sur les tentatives de transfusion intrapéritonéale in utero (167) que sur les tentatives de prévention par l'administration à la mère en cas de grossesse hétéro-spécifique de gammaglobulines anti-rhésus (70, 104, 107, 221).

b)- A côté de cette incompatibilité foeto-maternelle majeure, l'incompatibilité foeto-maternelle dans le groupe ABO, si elle est loin d'être exceptionnelle, revêt un intérêt différent.

Elle diffère, en effet, de la précédente par le caractère habituellement moins marqué de l'hémolyse et de l'anémie et se rapproche des ictères par immaturité hépatique que nous envisagerons plus loin, dans la mesure même où la gravité de la maladie tient plus au taux de la bilirubine sous la dépendance de l'immaturité hépatique qu'à la gravité de l'hémolyse elle-même (46, 108). La fréquence de cette étiologie dans les hyperbilirubinémies non liées à une incompatibilité Rh est estimée à 1/160 environ (108).

L'association à une incompatibilité ABO d'une incompatibilité Rh est possible, quoique assez rare. En effet, la possibilité de destruction des hématies foetales hétéro-groupes, dès leur passage dans la circulation maternelle, permet de comprendre la difficulté d'acquisition d'une immunisation anti-Rh.

c)- La fréquence de l'ictère hémolytique par incompatibilité foeto-maternelle relègue au second plan les tableaux d'hyperbilirubinémie pré-

coce par anémie hémolytique constitutionnelle.

Qu'il s'agisse de la sphérocytose héréditaire (163, 203) de diverses hémoglobinoses, ou de certaines enzymopathies érythrocytaires - et particulièrement celle observée le plus fréquemment sous nos climats, le déficit en glucose 6 - phosphatase déshydrogénase (G.6.P.D.) (109, 129) -, chacune de ces affections peut être à l'origine d'un ictère néonatal intense ou prolongé, dont l'étiologie n'est pas toujours évidente.

L'hyperbilirubinémie, là encore, est la préoccupation dominante, l'anémie restant modérée et jamais menaçante.

Une règle pratique d'importance est à retenir, afin de ne pas méconnaître une hémolyse pathologique : c'est de penser systématiquement à cette possibilité devant un ictère précoce avant la 24me heure, un ictère important dans les trois premiers jours, et de rechercher une immunisation par les examens habituels, une anémie sphérocytaire ou non sphérocytaire congénitale.

3)- Les ictères non hémolytiques néonataux.

1°- Dans cette catégorie d'ictères, l'hyperbilirubinémie n'est plus sous la dépendance d'un excès de production par hémolyse, ou tout au moins par hémolyse pathologique, mais en rapport le plus souvent avec une perturbation de la fonction hépatique de transformation de la bilirubine libre, c'est-à-dire de la glycuro-conjugaison.

Certaines autres hyperbilirubinémies non hémolytiques de la période néonatale paraissent un peu particulières par leur mécanisme, qui n'est sans doute pas limité à une immaturité hépatique.

2°- L'insuffisance de la fonction hépatique de glycuro-conjugaison peut être permanente ou transitoire.

a)- Lorsqu'elle est permanente, il s'agit de la maladie décrite en 1952 par CRIGLER et NAJJAR chez 7 enfants (80), et rapportée par ARIAS (17) à une absence d'activité de la glycuronyl-transférase. Si, sur le plan pratique, son importance est négligeable, sur le plan théorique elle est fondamentale. Cette affection, qui paraît transmise sur un mode récessif autosomique, s'exprime cliniquement par un ictère à bilirubine libre, débutant le plus souvent vers le 2me, 3me jour, caractérisé par son évolution sévère, puisque se faisant le plus souvent vers la mort (21 cas sur les 39 cas rapportés par KAPLAN et collaborateurs (149)) ou vers la survie, dramatiquement grevée par un ictère nucléaire (10 cas sur 39) apparaissant en règle au cours des trois premiers mois de la vie.

La bilirubine plasmatique est exclusivement constituée par la bilirubine libre. Elle atteint des taux variables, entre 200 et 300 mg/l.

Le déficit de la glycuro-conjugaison hépatique a pu être mis en évidence pour divers corps (Bilirubine, Menthol, N-Acétyl-Para-aminophénol, Chloramphénicol, Acide salicylique), in vivo ou vitro. Des discordances ont été notées (24, 149,247) qui impliquent une certaine réserve quant au mécanisme exact du trouble de glycuro-conjugaison : présence d'une certaine proportion de bilirubine conjuguée, mais on connaît les mécomptes techniques des dosages ; résultats variables ou contradictoires des épreuves destinées à mettre en évidence la réduction d'activité de la glycuronyl-transférase. On a signalé des altérations du pôle vasculaire de l'hépatocyte (24, 149) qui ont peut-être leur rôle à jouer dans la pathogénie de l'affection.

Un déficit identique existe, nous l'avons dit, dans une souche de rats, les rats Gunn (16, 31, 147, 239). Chez eux, comme chez les enfants atteints de la maladie de Crigler et Najjar, un fait est remarquable : c'est le maintien à un niveau constant de la bilirubinémie après la phase d'ascension

post-natale. Ce fait, compte tenu de la permanence de la production de bilirubine libre, de la permanence du trouble de la glycuro-conjugaison, suggère une voie métabolique différente. SCHMID et HAMMAKER (237) ont pu établir la réalité de ce mécanisme : une partie du pigment est transformée en un dérivé ne donnant plus la diazo-réaction, mais hydrosoluble et excrété par le foie. De plus, une partie du pigment traverse la muqueuse intestinale, tandis qu'une autre fraction, quoique non hydrosoluble, est excrétée par le foie.

Les rapports de la maladie de Crigler et Najjar et de l'ictère acholémique familial de Gilbert sont loin d'être éclaircis (4, 149).

Cette affection héréditaire est transmise sur le mode dominant. Son début se fait assez rarement dans la période néonatale, et alors l'hyperbilirubinémie est rarement menaçante. Plus souvent, l'ictère apparaît tardivement après la première année.

Il n'y a ni hémolyse, ni perturbation des épreuves fonctionnelles hépatiques.

Là, comme dans la maladie de Crigler et Najjar, une réduction de l'activité des systèmes de glycuro-conjugaison a été mise en évidence (12, 17). Par contre, dans d'autres cas, cette démonstration n'a pu être faite (236). On a suggéré que la cholémie familiale de Gilbert pourrait n'être que le mode d'expression à l'état hétérozygote de la tare, dont la maladie de Crigler et Najjar représenterait la forme achevée. Les arguments génétiques sont fort peu nombreux (4, 149) qui permettraient de lier ou de séparer définitivement les deux affections.

Il est possible, par ailleurs, que certaines hyperbilirubinémies indirectes, apparaissant en dehors de toute hémolyse, plus volontiers dans la première enfance, à l'adolescence ou à l'âge adulte que dans la période néonatale, et rangées dans le ca-

dre d'attente que constitue la maladie de Gilbert, relèvent d'un mécanisme différent du déficit héréditaire en glycuronyl-transférase.

b)- Lorsqu'elle est transitoire, l'insuffisance de la fonction hépatique de glycuro-conjugaison peut relever :

- soit d'un déficit transitoire de la glycuronyl-transférase. C'est celui-ci qui, sous le vocable d'immaturité hépatique, joue un rôle majeur dans la survenue de l'ictère néonatal du prématuré ou de l'ictère dit physiologique du nouveau-né à terme.

- soit d'une inhibition de la glycuro-conjugaison. Celle-ci peut relever d'étiologies variées, que de récentes études ont appris à mieux connaître, permettant ainsi d'identifier certains ictères de la période néonatale, jusque là recouverte par la notion commode d'immaturité hépatique.

1- L'ictère néonatal par "immaturité hépatique".

En effet, à l'heure actuelle, l'ictère physiologique du nouveau-né à terme, l'ictère néonatal du prématuré, sont conçus comme relevant essentiellement d'une immaturité enzymatique de siège hépatique.

On l'observe, en effet, chez le prématuré et chez le nouveau-né à terme. Mais il est loin de poser chez celui-ci les mêmes problèmes de pratique quotidienne que chez le premier, où il est beaucoup plus fréquent et source de complications sérieuses beaucoup plus souvent.

a/- Trois composantes essentielles sont à retenir dans le mécanisme de survenue de l'hyperbilirubinémie néonatale des prématurés. Ce sont :

1- La cessation de l'épuration par l'organisme maternel de la bilirubine foetale.

2- La production en excès de bilirubine.

3- Mais surtout, et c'est le fait essentiel, l'incapacité passagère du foie à conjuguer cette bilirubine libre (224).

1/- La cessation de l'épuration de la bilirubine foetale par l'organisme maternel.

SCHENKER, DAWBER et SCHMID (232) ont montré, en 1964, chez le cobaye, qu'un pourcentage important de la bilirubine libre injectée au foetus (52 à 66%) était excrété en deux heures dans la bile maternelle. Cette perméabilité du placenta vis-à-vis de la bilirubine libre paraît réellement sélective, puisque dans le même temps 4 % seulement de la bilirubine conjuguée injectée était excrétée.

LESTER, BERMAN et LUCEY (164), de la même façon, ont confirmé chez la guenon le passage transplacentaire de la bilirubine libre.

Cette notion de perméabilité sélective du placenta permet de supposer qu'il faut voir, dans le passage transplacentaire de la bilirubine foetale dans la circulation maternelle, le mécanisme principal de l'épuration plasmatique de la bilirubine libre formée par le foetus.

En effet, le foetus non plus que le placenta ne possèdent de système enzymatique propre à assurer la glycuro-conjugaison de ce pigment. On devrait,en l'absence d'un mécanisme d'épuration, assister à une ascension croissante du taux du pigment pendant la vie intra-utérine, alors que le taux de bilirubine du sang du cordon reste faible, même dans certains cas d'érythroblastose foetale (111).

La naissance à une vie autonome supprime cette épuration. L'apparition d'une hyperbilirubinémie, son importance vont dépendre alors des deux autres composantes : la quantité du pigment à épurer, les capacités de l'organisme à l'épurer, en d'autres termes d'en assurer la conjugaison.

2/- La production de bilirubine libre.

On s'accorde habituellement à penser que l'organisme du nouveau-né doit faire face, à la naissance, à un excès de production de bilirubine libre. La quantité de pigment libéré serait d'environ 17 mg/ 24 h. chez un nouveau-né à terme (59).

Si production excessive ou augmentée il y a, il faut en chercher l'origine dans un fonctionnement accru de la voie catabolique menant à la bilirubine à partir de l'hémoglobine des globules rouges circulants, donc dans une hémolyse néonatale.

Cette hémolyse néonatale est conçue, non comme un accident brutal de lyse globulaire comparable à ce qu'on observe dans les anémies hémolytiques néonatales, mais comme un phénomène plus progressif. La démonstration de son existence s'appuie sur de nombreux arguments directs ou indirects. Ainsi, la durée de vie des hématies marquées au Cr 51 est plus courte chez le prématuré (70 à 90 jours) que chez l'adulte (10, 187, 265, 290), mais elle serait plus longue que chez le nouveau-né à terme (57). Une augmentation de l'excrétion du fer dans les premiers jours de la vie a été constatée, ainsi que des modifications histologiques traduisant l'augmentation du fer dans le tissu réticulo-endothélial hépatique (230).

Ainsi acceptée, cette hémolyse pourrait être expliquée par une fragilisation particulière du globule rouge dans les premiers jours de la vie. Bien que sa résistance aux solutions hypotoniques paraisse normale, il y aurait fragilité ou fragilisation peut-être favorisée par certaines déficiences enzymatiques. Dès lors, un excès ou un défaut d'oxygène, des conditions métaboliques difficiles, et en particulier l'hypoglycémie dont il faut souligner la nocivité, détérioreraient un équilibre précaire et déclencheraient l'hémolyse de la partie de la population érythrocytaire la plus exposée.

En fait, le rôle que jouerait une destruction

globulaire exagérée paraît assez réduit. On n'a pu établir de relation significative entre le raccourcissement de la durée de vie des hématies et l'intensité ou la durée de l'hyperbilirubinémie (265). Il semble d'ailleurs que le maximum de la destruction érythrocytaire intervienne vers la troisième semaine de la vie, c'est-à-dire après la date de survenue de l'ictère néonatal (57, 187).

On peut se demander s'il y a réellement excès de production de pigment biliaire et quelle est la part de l'hémolyse dans cette production.

Peut-être faut-il chercher dans la fabrication, à partir de précurseurs héminiques autres que l'hémoglobine des érythrocytes, voire de précurseurs non héminiques à la faveur des remaniements hématopoïétiques de la période néonatale, une explication à cet excès de production.

Ainsi serait réalisée une hyperbilirubinémie, proche par son mécanisme de l'hyperbilirubinémie essentielle par shunt, décrite par ISRAELS et collaborateurs (137, 138, 139).

Il n'en est pas moins certain qu'une hémolyse même discrète accentue encore l'afflux de pigment sanguin au parenchyme hépatique.

Quelles que soient, en effet, les origines de ce pigment, l'enfant nouveau-né, séparé de l'organisme maternel, se trouve obligé, pour l'éliminer, de le transformer. Et bien souvent, cette transformation ne peut être opérée.

3/- L'incapacité passagère du foie à conjuguer la bilirubine libre.

BROWN et ZUELZER (59) ont bien étudié, chez le cobaye, le défaut de glycuro-conjugaison par le tissu hépatique chez l'animal nouveau-né et chez le foetus prélevé au cours de la gestation.

D'autres observations ont confirmé les données établies chez d'autres mammifères et chez le nouveau-né humain (159, 160).

L'inactivité concernerait deux des trois enzymes intervenant dans la glycuro-conjugaison : l'UDPG déshydrogénase, catalysant la production de l'acide uridine diphosphate glycuronique à partir de l'UDPG, et la glycuronyl-transférase, assurant le transfert de l'acide glycuronique de celui-ci à la molécule de bilirubine (FIGURE 1).

Expérimentalement, le déficit de la glycuro-conjugaison hépatique est d'autant plus important que le tissu est prélevé plus loin du terme. La capacité de glycuro-conjugaison représenterait en moyenne, chez le nouveau-né à terme 20 %, chez le prématuré 10 % de celle de l'adulte (264). Pour d'autres auteurs, elle ne représenterait que 1 à 2 %. Mais les variations individuelles sont importantes. Elle augmente progressivement et la différence s'annule vers le 15me-20me jour de la vie (9, 10, 33, 37, 56, 59, 111, 224).

Bien que l'activité de la β-glycuronidase soit plus élevée que chez l'adulte, il ne semble pas qu'une hydrolyse d'un glycuronide formé intervienne (59).

D'autres facteurs propres à la période néonatale peuvent venir aggraver cette incapacité transitoire ou en renforcer les effets. Les perturbations hémodynamiques néonatales de la circulation hépatique, l'anoxie relative qui en résulte pour le parenchyme hépatique (224) en sont un exemple.

Certaines circonstances pathologiques, qu'il n'est pas rare de rencontrer dans la période néonatale, tout particulièrement chez le prématuré, ont sans doute leur rôle à jouer. L'hypoglycémie, outre qu'elle contribue, ainsi qu'il a été dit plus haut, à accentuer l'hémolyse, freinerait également la conjugaison de la bilirubine (61, 113, 150, 249, 250) ; ce qui se conçoit aisément si on imagine que cette hypoglycémie entraîne une chute du niveau énergétique de

la cellule hépatique et son mauvais fonctionnement. L'anoxie jouerait un rôle comparable. Enfin, certaines drogues, et en particulier la vitamine K synthétique, peuvent être en cause par l'hémolyse pathologique d'hématies fragilisées ou tarées.

Ainsi, le déficit passager des fonctions de glycuro-conjugaison hépatique couronne l'enchaînement des faits qui vont mener à l'ascension du taux de bilirubine libre dans le plasma : suppression de la voie d'épuration transplacentaire, excès de production de pigment biliaire. Il semble que, dans cette pathogénie, on doive faire jouer un rôle fondamental au déficit enzymatique, ou supposé tel. La part due à une hémolyse néonatale paraît minime dans la genèse de l'ictère néonatal.

b/- Tableau clinique de l'ictère néonatal.

Ces données physiologiques éclairent le tableau de l'ictère néonatal par immaturité. Rappelons que l'ictère apparaît pour un taux de bilirubinémie voisin de 15 à 30 mg.

La fréquence de survenue est différente chez le nouveau-né à terme et chez le prématuré. Pour le premier, 20 à 25 % des enfants font un ictère qui est discret, d'évolution courte et bénigne (224). Pour les prématurés nés avant la 34me semaine, près de 95 % d'entre eux font un ictère (224, 281). La fréquence globale pour toutes les naissances serait d'environ 50 % (58, 179).

Bien entendu, tous les ictères ne se valent pas et l'importance de l'hyperbilirubinémie dépend de nombreux facteurs que nous envisagerons plus loin. Le tableau réalisé est cependant assez univoque pour qu'on puisse en donner une description d'ensemble.

Garçons et filles sont en proportion égale.

Le début de l'ictère est retardé après la 24me heure (90 % des cas environ), plus souvent le 2me

(60 % des cas environ) ou le 3me jour, mais parfois plus tardivement (224). Tout ictère précoce, avant la 24me heure (8,5 % des cas dans la statistique de ROSSIER), doit faire rechercher une autre étiologie et particulièrement une hémolyse.

La peau a une coloration jaune ou orangée, qui peut être masquée par l'érythrose cutanée, mais que la traction fait apparaître (224). L'intensité de l'ictère peut être appréciée par l'ictéromètre de GOSSET (117), qui fournit une mesure approchée du taux sanguin de bilirubine, mesure qui doit être contrôlée à partir du degré 4 de l'échelle colorimétrique, graduée de 1 à 5, par un dosage chimique.

Les muqueuses, bien que teintées, le sont proportionnellement moins, et devraient cette particularité au caractère liposoluble de la bilirubine libre, qui est la seule en cause (169).

Son insolubilité dans l'eau explique la coloration claire des urines, qui deviendront foncées, tachant le linge, quand elles se chargeront de bilirubine conjuguée. Par contre, les selles sont de coloration normale et contiennent du stercobilinogène.

Les chiffres maximums de bilirubine sont atteints habituellement entre le 3me et le 7me jour (58, 224). C'est à cette époque, après le 4me jour et surtout au 6me jour, qu'on redoute particulièrement l'apparition de signes annonçant la complication dramatique qu'est l'ictère nucléaire. Parfois, des vomissements bilieux témoignent du syndrome de stase pyloroduodénale décrit par ROSSIER et ALISON (223).

Dans cette période d'ascension de la bilirubine, des dosages répétés, pluriquotidiens, sont nécessaires pour suivre au plus près l'évolution du taux sanguin de la bilirubine, dont les variations peuvent être extrêmement rapides, en quelques heures.

La durée de l'ictère atteint en moyenne 6 à 10 jours, mais il peut exister encore le 15me jour ou ne

disparaître que vers le 21me jour (224).

Chez le nouveau-né à terme, lorsqu'il y a un ictère, le taux de bilirubine atteint dépasse rarement 50 mg/l (130), exceptionnellement 100 à 120 mg/l, pendant la première semaine de la vie (19, 58, 204).

Chez le prématuré, l'ictère est commun. L'évolution est plus prolongée, les niveaux de bilirubine atteints sont supérieurs à ceux du nouveau-né à terme. On peut ainsi dire que l'hyperbilirubinémie est une condition survenant chez des nouveau-nés de petit poids où elle est à la fois plus marquée et plus prolongée (34).

Mais à quel taux de bilirubine va-t-on, chez le prématuré, parler d'hyperbilirubinémie ? Le critère en est très variable selon les auteurs. LUCEY (169) propose qu'on parle d'ictères hyperbilirubinémiques lorsque le taux de bilirubine sanguine dépassera 100 à 150 mg/l pendant la première semaine de la vie, l'acmé étant en règle atteinte vers le 6me jour (83). La comparaison des nombreux résultats statistiques publiés est souvent malaisée, du fait du manque d'homogénéité des critères retenus d'une étude à l'autre d'une part, des différences de conditions de recrutement, d'élevage ou de thérapeutique d'autre part, ce qui traduit bien la pluralité des facteurs mis en jeu.

Intervient sans doute enfin la limite de confiance qu'on peut accorder au dosage de la bilirubine (172, 276), comme nous le verrons plus loin.

LUCEY estime (l'évaluation portant sur 742 enfants) que des chiffres supérieurs à 150 mg/l se voient chez environ 30 % de tous les prématurés et que 12 % ont un taux de bilirubine supérieur à 200 mg/l.

Pour ALISON (6) (étude portant sur 1.486 prématurés de moins de 2.000 g), 17 % ont une bilirubinémie supérieure à 180 mg/l. Pour ROSSIER (224), qui

a étudié 116 enfants de poids de naissance inférieur à 2.500 g, 33,6 % d'entre eux ont eu une bilirubinémie supérieure à 150 mg/l. Cette différence est à imputer pour l'essentiel au recrutement particulier à l'un et à l'autre service, le premier recevant surtout des prématurés d'un poids de naissance inférieur à 2.000 g, le second d'un poids de naissance supérieur à 2.000 g.

Elle met en lumière l'intervention d'un premier facteur, le poids à la naissance, intervention qui ne se fait pas exactement dans le sens où on l'attendait, compte tenu de ce qu'on sait de la maturation du système de glycuro-conjugaison.

En effet, la catégorie des prématurés pesant moins de 1.500 g à la naissance comporte moins d'hyperbilirubinémies supérieures à 180 mg/l (11 %) que celle des prématurés dont le poids de naissance est compris entre 1501 et 2.000 mg (18 %), sans que ce fait ait encore reçu d'explication.

D'autres facteurs interviennent, tantôt pour augmenter les risques de survenue d'une hyperbilirubinémie, tantôt pour en diminuer la fréquence (281, 169). On peut les séparer, suivant la date de leur intervention, en facteurs pré- et post-nataux.

- Les facteurs pré-nataux : des antécédents d'ictère dans la fratrie, la survenue d'hémorragies anté-natales, sont des causes favorisantes. Des maladies de la mère, deux sont connues comme favorisant avec certitude la survenue d'un ictère hémolytique : la thyrotoxicose, mais surtout le diabète maternel. Le mécanisme par lequel celui-ci intervient reste incompris et il est difficile de faire la part de la maladie maternelle, de l'hypoglycémie, ou de l'intervention d'un syndrome de détresse respiratoire dont on connaît la fréquence dans cette circonstance.

L'anoxie au cours du travail jouerait un rôle aggravant. Par contre, les effets des médications administrées pendant le travail paraissent réduits, si l'on excepte celles dont l'intervention, par un

mécanisme d'inhibition dont il sera question plus loin, est connue.

En sens inverse, interviendraient la post-maturité et le vieillissement maternel ; enfin, pour des raisons qui restent inexpliquées, l'existence d'une toxémie gravidique.

- Des facteurs post-nataux, il faut retenir le rôle néfaste de l'anoxie, de l'acidose et en particulier des syndromes de détresse respiratoire, de l'hypoglycémie (130, 162, 169, 185, 212, 213, 249, 250), ce qui est un des arguments des défenseurs de l'alimentation précoce du prématuré, d'une hémolyse pathologique surajoutée, parfois d'origine thérapeutique (Vitamine K), et de l'infection. Enfin, certaines substances médicamenteuses peuvent ajouter un effet inhibiteur propre au déficit de glycuro-conjugaison.

L'exposition à la lumière, par contre (6,77, 79, 169, 224), diminuerait la bilirubinémie, et cet effet, nuisible dans la manipulation au laboratoire des échantillons contenant de la bilirubine (214), est utilisé comme méthode thérapeutique.

2- Du cadre des ictères non hémolytiques du nouveau-né et du prématuré, ont successivement été dégagés des ictères liés à une inhibition du mécanisme de conjugaison, par diverses substances, d'origine naturelle ou médicamenteuse.

a/- En 1958, LATHE et WALKER (161) ont décrit les effets inhibiteurs sur la glycuro-conjugaison in vitro des sérums de femmes enceintes en fin de grossesse et de nouveau-nés. Ils obtenaient un effet inhibiteur comparable par l'administration de stéroïdes progestagènes.

HSIA (132) et ses collaborateurs, en 1960, confirmaient ces observations, isolaient quatre substances inhibitrices de la conjugaison de l'ortho-aminophénol, l'effet de compétition sur la glycuro-conjugaison étant particulièrement marqué pour le

prégnanediol, qui agirait ainsi en renforçant par un mécanisme d'inhibition l'immaturité du système de glycuro-conjugaison.

b/- En 1960, LUCEY, ARIAS et MAC KAY (171) décrivaient un ictère à bilirubine non conjuguée à qui ils donnaient le nom d'hyperbilirubinémie familiale néonatale transitoire. Les mêmes auteurs donnaient de ce syndrome une étude plus complète (19) en 1965.

Chez 24 enfants de 8 familles différentes, un ictère néonatal prolongé a été observé. Le début a eu lieu quelques heures après la naissance. Des taux très élevés de bilirubine ont été atteints (entre 120 et 650 mg/100 ml). Quatre enfants ont fait un ictère nucléaire et sont morts. La disparition de l'ictère s'est faite entre le 7me et le 15me jour, parfois plus tardivement.

Aucune des étiologies habituelles des ictères de ce type n'était en cause, dans ces ictères qui débutaient avant l'allaitement maternel sans que le sevrage modifiât leur évolution.

Les études des sérums des mères à partir du deuxième trimestre de la gestation et de ceux des nouveau-nés ont montré une inhibition de la glycuro-conjugaison de la bilirubine et de l'ortho-aminophénol 4 à 10 fois plus importante que celle réalisée par des sérums témoins. Le facteur inhibiteur en cause est inconnu. C'est probablement un stéroïde progestagène, mais différent du prégnanediol, différent de la substance inhibitrice contenue dans le lait maternel qui est en jeu dans l'ictère lié à l'allaitement maternel dont nous allons parler maintenant.

c/- ARIAS et ses collaborateurs (14) décrivaient, en 1963, un ictère néonatal prolongé, associé à l'allaitement maternel. Chez les enfants étudiés, en effet, nés à terme, ayant présenté pendant les cinq premiers jours un ictère modéré consi-

déré comme physiologique et nourris au sein à partir du 2me ou 3me jour, est apparu, entre le 7me et le 10me jour, un ictère franc avec élévation notable (140 à 250 mg/100 ml) de la bilirubine libre. Bien entendu, tant l'examen clinique normal que les examens biologiques négatifs éliminaient toute cause connue d'ictère.

Le rapport entre l'ictère et l'allaitement maternel a été suggéré par l'existence dans la fratrie d'ictères prolongés, chez des enfants nourris au sein, tandis que d'autres, nourris au lait de vache, n'avaient pas présenté d'ictère, et par la disparition de l'ictère après le sevrage. Sa réapparition suit la reprise de l'alimentation. L'évolution de l'ictère est bénigne, sans complication cérébrale.

L'action inhibitrice du lait de sein sur la glycuro-conjugaison de l'ortho-aminophénol et de la bilirubine par des homogénats ou des fractions microsomales de foie a été vérifiée.

Ultérieurement, l'agent inhibiteur a été isolé (15). Il s'agit du prégnane 3 ( ) 20 ( ) diol, qui est bien éliminé dans le lait des nourrices incriminées, mais n'existe pas dans leur sérum. Son action inhibitrice in vivo a été vérifiée.

Certes, ces étiologies d'ictères néo-nataux ne sont pas très fréquentes. Une trentaine d'observations d'hyperbilirubinémie familiale néonatale transitoire, et autant d'ictère néonatal lié à l'allaitement maternel ont été rapportées. La fréquence de survenue de ce dernier serait, pour HSIA (129), d'environ 1 pour 200 ou pour 500 naissances. Leur importance théorique est cependant considérable.

d/- Tout aussi importante est la démonstration, en 1961, par SUTHERLAND et KELLER (254), du rôle d'une drogue, en l'occurrence la novobiocine, dans la pathogénie de certaines hyperbilirubinémies du nouveau-né. La novobiocine a été reconnue par la suite comme un inhibiteur de la glycuronyl-transfé-

rase (127).

D'autres substances ont peut-être une action inhibitrice de la glycuro-conjugaison. Bien peu ont été étudiées dans ce sens. Aucune de celles qui l'ont été ne joue un rôle inhibiteur semblable à celui joué par la novobiocine. Si d'autres médicaments interviennent dans l'hyperbilirubinémie, ce peut être par un mécanisme différent. Nous avons vu la vitamine K favoriser l'hémolyse. Le sulfisoxazole (Gantrisine), les ions salicylés ne favorisent pas l'hyperbilirubinémie. Ils en majorent les effets et accroissent les risques d'ictère nucléaire, en déplaçant la bilirubine libre de sa combinaison avec l'albumine, comme nous le verrons plus loin.

D'autres médications favoriseraient, au contraire, la glycuro-conjugaison ; ce serait le cas du phénoberbital (284) dont l'utilité thérapeutique demande confirmation.

3- L'hyperbilirubinémie libre de la période néonatale peut relever d'autres étiologies qu'il est important de connaître, bien qu'elles soient, à vrai dire, assez rares.

a/- C'est ainsi qu'on connaît des ictères prolongés associés à une sténose hypertrophique du pylore (177, 179). Leur particularité, soulignée par ARIAS et collaborateurs (10), est d'être liée à une hyperbilirubinémie de type libre, dans la pathogénie de laquelle l'hypothèse d'une simple compression mécanique n'apparaît pas entièrement satisfaisante, malgré la démonstration chez l'animal. MARION et collaborateurs (177) ont relevé des concordances avec l'ictère de l'enfant nourri au sein (formes familiales, alimentation au lait maternel) dans leurs huit observations et posent la question de l'identité possible des deux affections.

D'autres atteintes organiques du tube digestif (obstacle duodénal en particulier) peuvent s'accompagner d'une hyperbilirubinémie de type libre.

AICARDI en relève 20 % dans une série de 39 enfants atteints d'occlusion néonatale (2). On ignore leur mécanisme exact : désordres métaboliques secondaires aux troubles digestifs ? Compression portale ou cholédocienne ? Rétention d'une substance inhibant la glycuro-conjugaison ?

b/- L'hypothyroïdie congénitale s'accompagne volontiers d'un ictère néonatal à bilirubine libre (rencontré dans 20 à 50 % des cas d'hypothyroïdie), comparable à l'ictère par immaturité hépatique, mais s'en éloignant par son caractère prolongé (4).

Il est très probable qu'un lien de causalité étroit existe entre le déficit en hormone thyroïdienne et la prolongation de l'ictère : l'administration d'hormone thyroïdienne permet d'obtenir une diminution rapide et significative de la bilirubinémie, confirmant ainsi l'importance pour la cellule hépatique de disposer d'un capital énergétique convenable, afin d'effectuer la glycuro-conjugaison.

On le voit, les étiologies possibles sont nombreuses. En fait, s'il est nécessaire de toutes les envisager devant un ictère de la période néonatale, leur énumération ne doit pas faire illusion. Deux grandes étiologies dominent ces ictères néonataux : les incompatibilités de groupes, l'ictère du prématuré. A côté d'elles, il faut faire une place dans certaines conditions géographiques aux ictères par tare enzymatique érythrocytaire (129).

B - LES DANGERS DE L'HYPERBILIRUBINEMIE INDIRECTE.

1 - A la diversité des étiologies possibles, s'oppose le caractère unique d'un danger commun : l'encéphalopathie bilirubinique.

Apanage quasi exclusif de la période néonatale, c'est une conséquence directe de l'hyperbi-

lirubinémie.

a)- Les descriptions de HERVIEUX (1847), de ORTH (1875) et quelques autres, plus anciennes, ont précédé le travail de SCHMORL (1903), basé sur l'étude de 102 cerveaux d'enfants ictériques. Il créa le terme d'ictère nucléaire (Kernikterus) (1904).

Ce terme d'ictère nucléaire, qui exprime de façon frappante la constatation anatomique du dépôt d'un pigment au niveau des formations nucléaires de la base du cerveau, atteinte non exclusive, mais souvent prédominante, a prévalu pour désigner le syndrome clinique correspondant à ces lésions. Par extension, on l'a également utilisé pour désigner les manifestations cliniques de la période des séquelles et les lésions anatomiques correspondantes où la pigmentation des noyaux gris a disparu (50). Aussi, le terme d'encéphalopathie bilirubinique présente l'avantage de mieux traduire l'identité pathogénique des lésions cérébrales et de leurs conséquences cliniques (50, 281).

b)- L'ictère nucléaire est d'abord considéré comme une complication d'états septicémiques, d'hépatites, ou d'une toxine indéterminée au même titre que de l'érythroblastose foetale, mais son étiologie reste obscure.

Après les travaux de LANDSTEINER et WIENER (1941) sur le facteur rhésus, la relation existant entre la grande majorité des ictères nucléaires et l'érythroblastose foetale est établie (69, 97, 262). L'exclusivité de cette étiologie est un moment admise, mais mise en doute rapidement par FORSTER et MAC CORMACK (106). La possibilité de survenue de tableaux de type ictère nucléaire dans d'autres hyperbilirubinémies libres est progressivement acceptée (34, 82, 118, 130, 229, 262), à la suite de ZUELZER et MUDGETT (291) et d'AIDIN, CORNER et TOVEY (3), non sans quelques controverses (68, 69).

c)- Description clinique : l'ictère nucléaire.

1°- L'apparition des troubles neurologiques a lieu de façon habituelle, entre le 2me et le 5me jour de l'ictère dans la maladie hémolytique néonatale (51, 198), entre le 4me et le 9me jour (118) dans l'ictère du prématuré, séparée donc de la naissance par une période d'intégrité du système nerveux. Mais la durée de celle-ci n'est pas fixe. Des débuts précoces sont possibles (50, 51) : quelques heures après la naissance, dans des cas de maladie hémolytique néonatale.

A l'inverse parfois, une exsanguino-transfusion tardive, insuffisante, diffère son apparition.

2°- La séméiologie clinique est largement dominée par les troubles du tonus (50, 51, 63, 97, 198, 261).

On peut, en respectant les données classiques, étudier les manifestations de la période aiguë, puis les manifestations chroniques ou séquelles. Leur séméiologie a été récemment reprise (51, 198).

a- Les manifestations cliniques de la période aiguë.

L'hypertonie est un des signes les plus fidèles, les plus constamment retrouvés, associé aux troubles oculaires et aux modifications du cri dont l'apparition est recherchée systématiquement par l'examen clinique, chez l'enfant.

L'hypertonie, certes, peut manquer (50, 51). Quand elle existe, ce qui est le cas le plus fréquent (80 à 90 % selon des estimations), elle atteint surtout les muscles postérieurs de la nuque et du tronc, d'où le rejet de la tête en arrière et l'attitude en opisthotonos, qui peuvent être déclenchées par le pincement. Des paroxysmes renforcent souvent une hypertonie permanente (51). Au niveau des membres, elle est moins marquée, fixant les membres supérieurs en flexion, les membres inférieurs en extension.

Des modifications du cri, qui devient aigu,

perçant, monocorde, des troubles oculaires lui sont souvent associés. De ces derniers, le plus souvent observé est l'attitude en coucher de soleil. D'autres dyskinésies oculaires (strabisme, nystagmus) peuvent être rencontrées (50, 51, 63). Des troubles du comportement (agitation, inertie, parfois alternants), des mouvements anormaux des membres, surtout supérieurs, peuvent se voir. Des troubles respiratoires : irrégularités du rythme, apnées, accès de cyanose, sont parfois observés et revêtent un certain caractère de gravité (51). Si la constatation d'une hyperthermie, la survenue de vomissements sont des données classiques, la survenue de crises convulsives revêt, par contre, un caractère exceptionnel.

Ces signes cliniques se groupent de différentes façons : le tableau peut être complet (ictère nucléaire global de Bertrand). Certaines formes moyennes ne groupent que deux, trois ou quatre éléments; d'autres formes, frustes ou larvées, moins encore. Leur existence suffit cependant à reconnaître, dans la grande majorité des cas, l'ictère nucléaire (94 % des cas pour T. DOREAU et collaborateurs (51)).

Deux points sont à souligner :

- Le premier est que ces signes cliniques tardifs n'ont pas un caractère d'alarme, mais une signification diagnostique péjorative, puisqu'ils traduisent la constitution de dégâts anatomiques cérébraux irréversibles. VAN PRAAGH (261) a bien décrit des signes prémonitoires : l'apathie, la somnolence, les modifications des réflexes archaïques et du réflexe de succion, au premier plan, permettraient un diagnostic et un traitement plus précoces. Mais ces manifestations cliniques sont dépourvues de spécificité ; elles peuvent, dès ce stade, selon l'auteur lui-même, correspondre à des lésions cérébrales telles que la mort survient avant toute spasticité ; leur existence même a été mise en doute par T. BOREAU, pour qui, "en dehors de l'intensité de la jaunisse, il semble que rien ne permette de prévoir l'ictère nucléaire avant son installation" (51).

On ne peut donc baser sur leur dépistage une prévention efficace de l'ictère nucléaire.

- Le second est que tous ces signes peuvent être en défaut, quand bien même un ictère nucléaire est installé, qui s'exprimera alors ultérieurement par les séquelles de la période chronique. Le pourcentage de ces formes est diversement estimé : de 6 à 16 % environ (50, 51, 261).

b- Les manifestations de la période chronique ou séquelles.

Lorsque l'enfant survit à la période aiguë, on redoute les séquelles. Elles apparaissent après une période dite de rémission ou de latence clinique.

Cette période est exceptionnellement marquée par une disparition complète de la symptomatologie de la période aiguë (51), plus souvent par une atténuation de l'hypertonie (51, 261) pouvant aller jusqu'à l'hypotonie (216).

Le trouble du développement psychomoteur, apparent dès le 4me-5me mois, s'affirmera avec le retard des acquisitions successives de la préhension, de la station debout, de la marche. Il est doublé de troubles du comportement dominés par une agitation à prédominance souvent nocturne (51). Le retard intellectuel, s'il est pour certains constant, apparaît pour d'autres (216) n'avoir pas de caractère obligatoire et, quand il existe, être modéré : 70 à 90 % des enfants auraient un Q.I. supérieur à 70. Des crises convulsives peuvent survenir.

Les troubles de la motricité associent au fond permanent de l'hypertonie de type extra-pyramidal, qui s'accentue vers le 4me mois, des mouvements involontaires, dits athétosiques ou choréo-athétosiques. Ils n'apparaîtraient pas avant l'âge d'un an, voire de 18 mois (63). On les observerait dans au moins 50 à 80 % des cas. L'inexpressivité grimaçante, une dysarthrie les accompagnent. La constatation d'une

séméiologie pyramidale associée n'est pas exceptionnelle (63, 216), mais apparaît moins fréquente que les troubles cérébelleux.

Aux troubles oculaires déjà cités, "paralysie du regard", le plus souvent partielle (51), s'ajoute l'atteinte d'une autre paire crânienne : la surdité, loin d'être exceptionnelle, représente une complication fréquente (20 à 80 % des cas) (198) et redoutée, car, définitive, elle aggrave le déficit intellectuel de ces encéphalopathies bilirubiniques.

Ces séquelles redoutables font la gravité des formes chroniques de l'ictère nucléaire. Elles ne sont pas inéluctables, presque absentes dans un nombre limité d'ictères nucléaires authentiques (51), mais imprévisibles dans leur survenue et leur importance, qui ne sont pas étroitement liées à la sévérité du tableau de la période aiguë.

Cette absence de parallélisme est soulignée par la connaissance de formes révélées à l'âge des séquelles, soit par des manifestations d'encéphalopathie spasmodique (51, 63), soit par une surdité isolée (20, 74, 103, 124, 136).

3°- La gravité du pronostic de l'ictère nucléaire n'est pas faite que des séquelles. La mort est une éventualité possible, soit au cours de la période aiguë, soit un peu plus tardivement, dans les semaines ou les mois qui suivent.

Il est malaisé d'apprécier la fréquence des formes mortelles qui varie avec l'étiologie.

Dans la population générale, avant l'ère de l'exsanguino-transfusion, on rencontre un ictère nucléaire dans 8,8 % des autopsies d'enfants nouveau-nés à terme ou prématurés (69). Les trois-quarts de ces ictères nucléaires environ sont secondaires à une maladie hémolytique néonatale.

Au cours de la maladie hémolytique néonatale

par incompatibilité foeto-maternelle, l'estimation de la fréquence de survenue d'un ictère nucléaire varie, selon les auteurs, de 15 à 35 % (7, 48, 68, 95, 261). De ces formes, 35 à 40 % environ ont une évolution spontanée mortelle (189, 261), les survivants ayant, dans une forte proportion (75 à 90 % des cas environ), des séquelles importantes.

Chez le prématuré, certaines estimations paraissent excessives et à écarter. Des chiffres aussi éloignés que 0 et 50 % d'ictère nucléaire responsable de décès de prématurés témoignent de l'hétérogénéité des résultats proposés (169).

Plus homogènes apparaissent les estimations suivantes : pour ALISON (6), un ictère nucléaire est responsable de 1,4 % de tous les décès survenus chez 2.159 prématurés de 2.000 g et moins avant l'exsanguino-transfusion. M. CROSSE (82) le rencontre dans 2,3 % des autopsies de prématurés, chiffre qu'on peut comparer aux 2,6 % de la série de ROSSIER (224) et aux 2,3 et 3,6 % rapportés par GERRARD (114).

La réalité de survenue d'une encéphalopathie bilirubinique au cours des ictères à bilirubine libre n'est donc pas douteuse. Si sa fréquence est particulièrement élevée dans les ictères par incompatibilité foeto-maternelle, son importance dans la prématurité ne doit pas être négligée.

C - LES MÉCANISMES DE SURVENUE DE L'ICTÈRE NUCLÉAIRE.

1 - Toxicité de la bilirubine libre pour les cellules cérébrales.

a)- Anatomiquement, le dépôt de pigment dans certaines structures du système nerveux central a été très tôt reconnu.

La coloration jaune du cerveau, qui n'e-

xiste jamais chez les enfants mort-nés, est constamment observée dans les autopsies des enfants décédés d'ictère nucléaire au cours de la première semaine de la vie. Il ne s'agit pas d'une simple coloration de surface, banale au cours de tout ictère intense, mais d'une pigmentation élective de la substance grise. Celle-ci atteint préférentiellement certaines structures, et en particulier les noyaux gris de la base. Sont particulièrement intéressés les noyaux caudés, le putamen et le globus pallidus, le noyau sous-thalamique de Luys, mais aussi le noyau rouge, le locus niger, le noyau dentelé, l'olive bulbaire, les corps mamillaires, le cortex cérébelleux, le thalamus. La coloration des noyaux cochléaires et vestibulaires, ainsi que du noyau du III est fréquente. Rare, par contre, est la pigmentation de plages du néocortex (50, 198).

D'autres lésions associées de la pathologie néonatale (nécrose, hémorragies) peuvent être rencontrées (50).

Microscopiquement, le dépôt pigmentaire s'accompagne d'une atteinte histologique précoce et intense (50, 63, 291). Il existe une véritable nécrose cellulaire avec raréfaction de la population cellulaire, turgescence capillaire et réaction microgliale débutante.

Des lésions extra-neurologiques ont pu être observées, principalement de nécrose cellulaire, qui ont été rapportées à la toxicité de la bilirubine (30).

Dans les observations anatomiques d'encéphalopathie post-ictérique, par contre, la pigmentation a disparu, mais des lésions histologiques très sévères, assez comparables à celles observées au cours de la période aiguë, existent : nécrose cellulaire et réaction gliale (50).

b)- La responsabilité de la bilirubine dans l'ictère nucléaire est maintenant unanimement admise.

1°- Tous les caractères physico-chimiques du pigment déposé sont ceux de la bilirubine (69, 271).

2°- Expérimentalement, l'injection de solution de bilirubine dans la carotide, chez différentes espèces animales, a permis de reproduire un ictère nucléaire (69, 93, 225), semblable à celui qu'on peut observer chez les rats Gunn, héritiers d'un déficit en glycuronyl-transférase (145, 147) et chez le nouveau-né humain.

3°- Plus récemment, des preuves expérimentales de la toxicité de la bilirubine au niveau cellulaire ont été apportées. On a mis en évidence la diminution des activités métaboliques de la cellule cérébrale et hépatique, de l'activité des préparations mitochondriales, de la croissance de cultures de tissus et d'organismes unicellulaires (78, 87, 92, 102, 233).

La plupart des auteurs ont constaté une diminution de la consommation d'oxygène et une réduction de la synthèse de l'A.T.P. (233). Le mécanisme exact de cet effet toxique reste hypothétique : il pourrait s'agir d'une inhibition de la phosphorylation oxydative que suggèrent les observations faites in vitro (93, 102, 267) ou/et une inhibition de la chaîne d'électrons (78, 78 bis). L'abaissement de pH augmenterait la toxicité du pigment (78).

2 - Le passage de la bilirubine à travers la barrière hémocérébrale.

a)- La notion de barrière hémocérébrale.

1°- La conception d'une barrière protégeant le parenchyme cérébral est ancienne et débute avec les travaux d'EHRLICH, LEVANDOWSKY, puis de GOLDMANN. Initialement conçue comme une barrière hémo-méningée, elle paraît, à l'heure actuelle, être une barrière hémocérébrale (capillaro-cérébrale), dont la perméabilité est très sélective.

En effet, la fonction de protection du parenchyme cérébral est très généralement attribuée aux trois couches que réalisent : les cellules endothéliales des capillaires cérébraux, la membrane basale constituée de lipides et de muchopolysaccharides PAS positif, enfin les podocytes astrocytaires (29).

2°- Une constatation peut être faite quant au risque de survenue d'une encéphalopathie bilirubinique dans les hyperbilirubinémies indirectes, et elle est essentielle.

Le risque n'existe que dans la période néonatale. Il n'apparaît jamais, quels que soient les taux de bilirubine atteints (ictères hémolytiques, par exemple) chez le grand enfant ou chez l'adulte. Cette règle souffre peu d'exceptions : on ne connaît guère que l'apparition tardive d'un ictère nucléaire dans des cas de maladie de Crigler et Najjar (149).

Cette constatation se double de celle de l'innocuité toujours observée de la bilirubine directe (glycuro-conjuguée) pour le système nerveux central. On y voit là une prolongation de l'opposition largement affirmée entre les deux types de bilirubine : l'une glycuro-conjuguée hydrosoluble, dont la molécule ne peut franchir la barrière hémocérébrale imperméable aux larges molécules hydrosolubles (25, 91, 93, 207) ; l'autre libre, liposoluble, dont l'affinité pour les lipides permet le passage à travers la membrane protido-lipidique, l'entrée dans la cellule nerveuse et la création, de par sa toxicité propre, de lésions cellulaires. Il a été prouvé que le passage ne pouvait s'effectuer sous forme du complexe albumine-bilirubine (78 bis, 93).

C'est donc sous sa forme libre que la bilirubine trouve accès à la cellule cérébrale, comme d'autres molécules liposolubles non ionisées (25, 93).

Ainsi, et c'est un point capital, le passage de la bilirubine dans le parenchyme cérébral

apparaît comme réglé, d'une part par sa solubilité dans les lipides, d'autre part par le degré de liaison protéique plasmatique de la molécule de bilirubine libre.

3°- Mais, dans ce cas, pourquoi, si la bilirubine libre peut franchir la barrière hémocérébrale, l'ictère nucléaire est-il réservé à la période néonatale ? La réponse à cette irritante interrogation fait intervenir un concept assez commode, quoique imprécis, d'"immaturité" de cette barrière hémocérébrale. Certains faits expérimentaux, il est vrai, plaident en faveur d'une maturation progressive d'une structure au moins fonctionnelle existant dès le foetus (25, 91, 207). Il pourrait s'agir, par exemple, de différences dans la perméabilité capillaire, faisant intervenir un facteur de diffusion, plutôt que d'un phénomène de tout ou rien à partir d'une certaine concentration plasmatique critique (207).

Ces modifications de la perméabilité capillaire sont-elles une conséquence de changements de structure de la substance fondamentale ? HESS (125), en effet, a montré que la réaction au PAS, normalement positive au niveau de la membrane basale, est négative chez le souriceau jusqu'au 5me jour. Ou bien, s'agit-il de la défaillance d'une activité métabolique indispensable à l'exercice de la perméabilité sélective, comme le suggèrent les faits expérimentaux apportés par ERNSTER et ses collaborateurs.

Ces variations de la perméabilité capillaire sont sans doute sous la dépendance de conditions anormales de fonctionnement, plus aisément réalisées dans la période néonatale.

Ainsi, l'anoxie cérébrale, l'acidose augmentent de façon certaine, expérimentalement (78, 93), le passage du pigment à travers la barrière hémocérébrale, chez l'animal adulte comme chez le nouveau-né.

L'acidose favorise-t-elle ce passage

en augmentant la perméabilité de la membrane ? Ou plus probablement, en modifiant la dissociation de cet acide organique faible qu'est la bilirubine, en rendant ainsi disponible, au passage à travers la membrane, une fraction lipophile importante (25, 93).

L'élévation du taux de l'ammoniémie faciliterait le franchissement de la barrière (224).

L'hypercapnie n'aurait aucun rôle à jouer (93).

Les corticoïdes diminueraient, à l'inverse, la perméabilité de la barrière (29).

b)- La diffusion du pigment dans le parenchyme cérébral n'est pas un phénomène irréversible. On a dit que deux stades pouvaient être observés à l'examen anatomique : l'un précoce, de diffusion sans prédominance élective, tel qu'on l'observe dans les hyperbilirubinémies sévères précoces ; l'autre tardif, de pigmentation localisée à certains territoires, qui varieraient d'ailleurs selon l'espèce (noyaux de la base, chez le nouveau-né, le cobaye, cervelet chez le rat Gunn). Ce dernier stade s'observerait toujours lorsque cliniquement l'encéphalopathie bilirubinique est évidente (93, 233). Irréversible, il s'accompagne des effets toxiques envisagés plus haut sur le métabolisme cellulaire. Le premier stade serait, lui, réversible.

Cette réversibilité de la diffusion du pigment est discutée. On admet, en effet, difficilement que des lésions histologiques de cytolyse, souvent diffuses, intenses, observées parfois de façon précoce au cours des autopsies d'enfants décédés en pleine période aiguë, puissent être réversibles. C'est là un point d'importance capitale qui n'est pas entièrement éclairci.

Il reste que l'absence de comportement "standard" de la barrière hémocérébrale, dont la perméabilité peut se trouver modifiée de diverses façons, dans la période néonatale, fait déjà imagi-

ner la difficulté de fixer un seuil critique de la bilirubinémie, à partir duquel le risque d'ictère nucléaire est tel que des mesures thérapeutiques urgentes s'imposent. D'autres facteurs vont encore ajouter à ces difficultés.

3 - Notion de seuil critique de la bilirubinémie.

a)- La nécessité de définir un niveau dangereux de la bilirubinémie est apparue lorsqu'on a pu disposer d'un moyen thérapeutique efficace pour prévenir l'apparition de l'ictère nucléaire : l'exsanguino-transfusion, qui reste de loin la méthode la plus employée dans le traitement de la maladie hémolytique néonatale au premier chef, mais aussi dans les autres hyperbilirubinémies et notamment dans l'hyperbilirubinémie du prématuré. L'apparition d'autres moyens thérapeutiques (photothérapie) n'a pas fait disparaître la nécessité de disposer d'un critère objectif pour mesurer la gravité de l'hyperbilirubinémie.

b)- Dans une première étape :

En raison des connaissances réduites de tous les facteurs entrant en jeu dans l'installation d'un ictère nucléaire, un taux de 180 (179), puis 200 mg/l (131) a été considéré comme guide pratique de l'opportunité de l'exsanguino-transfusion, chez les enfants atteints d'érythroblastose foetale (94, 131). En effet, un ictère nucléaire survient rarement pour un taux de bilirubine inférieur à cette valeur. Par contre, sa fréquence augmente pour des taux supérieurs à 300 mg/l (131, 169). De nombreux auteurs (76, 83, 183, 189) ont pensé qu'il convenait d'appliquer les mêmes critères chez le prématuré hyperbilirubinémique, et Mary CROSSE avait fixé un seuil de 180 mg/l, dont le franchissement déclenchait l'exsanguino-transfusion.

c)- Par la suite, des observations contradictoires se sont multipliées. Les unes (1, 82, 122, 252, 259) insistent sur la possibilité de survenue

d'un ictère nucléaire pour des concentrations de bilirubine inférieures à 180, voire à 140 mg/100 ml. Les autres, sur la possibilité d'absence de toute complication pour des taux supérieurs à 400 mg/l (101) ou sur l'absence de toute relation entre le taux de bilirubine constaté et la survenue d'un ictère nucléaire (220, 244).

Récemment, BOGGS et ses collaborateurs (42) ont publié les premiers résultats d'une étude d'ensemble portant sur 23.000 enfants, et destinée à préciser l'existence ou l'absence de relation entre les taux de bilirubine atteints dans la période néonatale et l'état du développement des enfants à l'âge de 8 mois. De cette étude, ils tirent la conclusion provisoire qu'il existe bien une relation, quel que soit le groupe envisagé, entre hyperbilirubinémie et retard du développement. Cette relation n'apparaît pas brusquement à partir d'un seuil de 20 mg %, mais peut être constatée pour des taux de 160 à 190 mg/l.

Bien que ces discussions ne soient pas closes, l'expérience a prévalu qu'on ne courait pas grand risque à élever le seuil de bilirubinémie à partir duquel l'exsanguino-transfusion est décidée. Des chiffres supérieurs à 200 mg/100 ml ont été adoptés par certains : 240 à 250 mg/l (9, 112, 224, 280) ou même 300 mg/l (200).

Il est néanmoins certain qu'un ictère nucléaire peut parfaitement survenir pour un taux de bilirubine largement inférieur au seuil admis communément (50, 122, 252). Ceci est particulièrement vrai chez le prématuré, particulièrement exposé en raison des conditions physiologiques et métaboliques qui sont les siennes : inaptitude à la glycuro-conjugaison, fragilité cellulaire et sensibilité particulière à l'hypoglycémie, à l'anoxie, à l'acidose, toutes aisément réunies, enfin perméabilité particulière de la barrière hémocérébrale, dans ces mêmes conditions.

Ainsi, on serait heureux de disposer d'un critère précis, permettant de situer le seuil dangereux dont l'approche déclencherait l'intervention thérapeutique.

Il n'est pas certain, c'est même plutôt l'impression contraire qui se dégage, qu'il doive s'agir d'une limite stricte, tranchée, d'un seuil collectif, que sont les valeurs habituellement retenues comme critère d'intervention.

C'est bien plutôt à l'intérieur d'une échelle de valeurs assez étendues de la bilirubinémie, allant de 150 à 300 mg/l, qu'il serait souhaitable de disposer d'une méthode permettant de déterminer un seuil individuel, commandant les mesures thérapeutiques urgentes.

Ceci est d'autant plus vrai que les difficultés cliniques, auxquelles on se heurte pour fixer un niveau critique de la bilirubinémie, se doublent de difficultés d'un autre ordre, techniques celles-ci, que nous envisagerons maintenant.

- III -

LE LABORATOIRE ET LA BILIRUBINE

De tout temps, la bilirubine a été un produit difficile à manier et nous n'en voulons pour preuve que la multiplicité des techniques qui ont été décrites pour en assurer la caractérisation et le dosage.

Celui-ci, s'il est entré dans la pratique courante, ne donne de garanties que s'il est effectué dans les conditions techniques extrêmement rigoureuses. Même alors, c'est d'un coefficient d'imprécision assez grand qu'il est affecté, dont il doit être tenu compte dans l'appréciation des résultats.

A - LE DOSAGE DE LA BILIRUBINE SERIQUE EN PRATIQUE COURANTE.

1 - C'est à HIJMANS VAN DEN BERGH (1918) que l'on doit la reconnaissance des deux modalités de comportement de la bilirubine plasmatique, au cours de la réaction avec le diazo-réactif d'EHRLICH (1884) (66, 72, 110, 186, 288), comme la reconnaissance de l'extraordinaire correspondance clinique de ce dualisme réactionnel (66).

Lorsque le diazo-réactif et le sérum sont mélangés, deux éventualités peuvent se produire :

- ou bien le mélange prend immédiatement une coloration rouge violacée caractéristique ;

- ou bien le mélange ne donne de coloration que de façon retardée.

La première éventualité caractérise la bilirubine directe ; la seconde, la bilirubine indirecte, dont la réaction retardée peut être transformée en réaction immédiate par addition d'un solvant (alcool méthylique, par exemple).

Des travaux ultérieurs (71, 235) ont permis, après de multiples hypothèses, dont certaines mettaient en doute la réalité de cette dualité de comportement, de confirmer et d'éclairer celle-ci. La réaction directe n'a lieu qu'en présence de bilirubine conjuguée hydrosoluble, tandis que la réaction retardée est le fait de la bilirubine libre, chloroformo-extractible.

2 - Cette distinction de qualité directe ou indirecte de la bilirubine, si elle garde, dans le cadre de cette étude, l'importance clinique et physiopathologique fondamentale qui lui est ailleurs reconnue, offre, pour nous, dans le domaine du laboratoire, un intérêt limité. Nous nous adressons, en effet, à cette catégorie d'ictères du nouveau-né qui tirent leur gravité du caractère libre de l'hyperbilirubinémie. La proportion de bilirubine directe, en effet, reste extrêmement faible dans la période dangereuse de ces hyperbilirubinémies (Elle ne dépasserait pas le 1/10 de la bilirubinémie totale) (122).

a)- Aussi, le dosage de la bilirubine totale représente, dans ces cas, une estimation approchée parfaitement valable d'un phénomène quantitatif, sans qu'il soit nécessaire de recourir aux dosages sélectifs des deux fractions, ce qui entraînerait alors la multiplication des discussions techniques (72).

La plupart des méthodes utilisées de façon habituelle pour ce dosage quantitatif de la bilirubinémie totale sont des méthodes de colorimétrie indirecte dérivées de la technique originale de diazo-réaction de Hijmans Van den Bergh.

b)- En effet, les méthodes de colorimétrie directe, utilisant la propriété de la bilirubine d'absorber les radiations jaunes du spectre, ont de nombreux inconvénients : en particulier, l'existence de deux maximums d'absorption (410-420 mμ et 450-460 mμ) dont les rapports des densités optiques varient avec les sérums (66), l'interférence possible de l'hémoglobine au premier maximum (1,66), enfin la présence possible, dans le sérum, d'autres chromogènes jaunes (66). Elles sont cependant utilisées avec certains aménagements (1, 40, 181, 275).

c)- Des techniques de colorimétrie indirecte, la diazo-réaction est la plus sensible et la plus spécifique. Dans le dosage de la bilirubinémie totale, la révélation totale est effectuée par l'éthanol, dont l'addition entraîne une précipitation des protéines sériques que deux procédés couramment employés permettent d'éviter (66, 72).

1°- Dans la technique de MALLOY et EVELYN (176), une forte dilution aqueuse empêche cette précipitation, tandis que celle de JENDRASSIK et GROF (143) recourt à un mélange tampon au benzoate de sodium et à la caféine. La lecture au spectrophotomètre s'effectue à 518 mμ, longueur d'onde du maximum d'absorption.

Si l'inconvénient de la première méthode est d'être (à cause de la dilution) peu sensible pour les valeurs basses, il s'agit là d'un inconvénient mineur dans la perspective qui nous intéresse. Par contre, la technique de JENDRASSIK, utilisant un milieu de réaction alcalin où la bilirubine est peu stable, fournit des résultats volontiers trop élevés (66, 72).

2°- De nombreuses variantes de ces deux méthodes ont été décrites. Elles ont porté sur deux aspects :

- Le premier est celui des conditions de prélèvement, avec la mise au point de microméthodes permettant la répétition de mesures indispensables, de façon

souvent pluriquotidienne, à la période d'ascension de la bilirubinémie.

Les microméthodes, extrêmement utiles, introduisent un coefficient d'erreur quasi constant, quand on contrôle les résultats par référence à la même technique effectuée sur un macroprélèvement (181). Aussi, les déterminations faites par le laboratoire du Centre départemental de Transfusion sanguine sont-elles toujours effectuées sur macroprélèvement.

- Le deuxième est celui des causes d'erreur et de variations des résultats, qui sont nombreuses, bien connues et auxquelles il est difficile de remédier.

Si on peut aisément éviter l'hémolyse, source d'erreurs (1, 66, 184, 278), la première par interférence au maximum d'absorption, la seconde par destruction de la bilirubine après addition du solvant, si on peut éviter l'exposition à la lumière, dont on sait qu'elle fait disparaître la bilirubine en l'oxydant en un dérivé non pigmenté, non accessible à la diazo-réaction (172, 214), d'autres problèmes sont plus difficiles à résoudre.

Ainsi, celui de la composition de la substance tampon, qui tient sous sa dépendance la quantité de bilirubine révélée et la coloration obtenue (66). Les valeurs diffèrent selon l'alcool d'extraction utilisé (181) et selon le pH du milieu (184),ce qui peut être responsable de variations entre l'échantillon sérique et les standards colorés.

Si la stabilité et la conservation des réactifs (64, 176) peuvent être source de difficultés, plus irritant est le problème de l'intervention dans la diazo-réaction de la liaison bilirubine - albumine.

Celle-ci est à l'origine d'estimations très différentes de la bilirubine (jusqu'à 50 % d'écart), selon qu'on dispose d'une préparation standard de bilirubine en solvant organique, habituellement adop-

tée, ou d'une préparation en tampon albumine (277).

B - LES CONSEQUENCES DES DIFFICULTES TECHNIQUES.

Ces difficultés techniques nombreuses expliquent :

1- Les écarts des valeurs de la bilirubinémie, déterminées à partir d'un même échantillon par des méthodes différentes (184).

2- Les écarts enregistrés entre les mesures de la concentration de la bilirubine d'échantillons connus, réalisées par des laboratoires différents, avec la même méthode.

3- La différence fréquemment observée dans les pourcentages d'hyperbilirubinémies sévères, d'un hôpital à l'autre.

C'est ainsi que les chiffres comparés de deux hôpitaux (172) ont fait apparaître la fréquence particulièrement élevée dans l'un (40 contre 10 %), des hyperbilirubinémies supérieures à 200 mg/l, avec son corollaire, l'augmentation du nombre d'exsanguino-transfusions (16 % contre 2,5 %).

Dans notre étude, l'écart moyen des mesures effectuées, d'une part au Laboratoire de Pharmacie de l'Hôpital Hérold (technique en tampon caféiné), et d'autre part à titre de contrôle au Centre départemental de Transfusion sanguine (technique de MALLOY et EVELYN), est de 22 mg (10 % environ).

Ces différences souvent élevées et l'importance de leurs conséquences ont conduit le comité pour le foetus et le nouveau-né de l'Académie américaine de Pédiatrie à élaborer des recommandations sur une procédure d'établissement d'un "standard de bilirubine" (73) et sur la préparation de solutions de

bilirubine en milieu sérique, à partir de ce "standard" aux caractéristiques d'absorption bien définies.

Il est communément admis qu'une bonne détermination du taux de bilirubine totale est exacte à 5 ou 10 % près, et qu'une variation de ce taux d'un dosage à l'autre doit atteindre 15 % pour être significative (181, 279).

Il faut, pour cela, s'appuyer sur un laboratoire utilisant une méthode de mesure éprouvée, effectuant la mesure dans de bonnes conditions techniques, aisément reproductibles sur un prélèvement correctement recueilli, contre un étalonnage soigneux, et ayant une pratique quotidienne de ces déterminations. Dans ces conditions, les résultats obtenus sont en règle assez fidèles pour servir de points de repère, même si, pour des raisons pratiques de répétition pluriquotidienne des dosages, nécessitées par l'ascension de la bilirubinémie et l'approche de la zone dangereuse, on s'adresse aux microprélèvements.

Lorsque la possibilité d'un contrôle rigoureux, effectué par un dosage sur prélèvement macroscopique, comme ceux réalisés quotidiennement par le laboratoire du Centre départemental de Transfusion sanguine, existe, la garantie s'accroît considérablement.

Mais ces conditions sont loin d'être toujours remplies. L'erreur étant possible en plus ou en moins, certaines hyperbilirubinémies dangereuses sont sans doute méconnues et, à l'inverse, certaines fausses hyperbilirubinémies sont créées par la technique.

- IV -

INTÉRÊT THÉORIQUE D'UNE MÉTHODE DE DOSAGE DE LA CAPACITÉ DE FIXATION DE LA BILIRUBINE PAR LA SÉRUM-ALBUMINE

Nous venons de montrer les difficultés de la détermination correcte du taux de bilirubine. Nous avons vu que la connaissance de ce taux ne permettait, de façon certes extrêmement utile, mais empirique et approchée, que d'évaluer les risques de survenue d'un ictère nucléaire. La clinique, quant à elle, n'est guère capable que d'en constater la survenue, tandis que des lésions silencieuses peuvent se constituer (91).

Aussi, aimerait-on disposer d'un examen capable de suppléer à l'imprécision que la simple mesure de la bilirubine, comme critère du danger d'encéphalopathie bilirubinique, apporte à la prophylaxie de cette complication des ictères hyperbilirubiniques du nouveau-né et du prématuré.

En effet, disposer de la seule concentration de la bilirubine plasmatique est d'un intérêt médiocre pour (60, 200) connaître la répartition de la bilirubine dans l'organisme, la concentration possible de la bilirubine dans les espaces extra-vasculaires et plus encore dans les tissus. On en veut pour seule preuve le niveau bas de la bilirubinémie qu'on peut observer chez des enfants atteints d'un ictère nucléaire dont l'apparition avait été précédée de

l'ascension habituelle (122). Il correspond à la diffusion du pigment, accrue par les altérations cellulaires (193) dans un nouvel espace, ce qui abaisse la concentration sanguine, dont la mesure isolée n'est plus d'aucune signification.

Seule, la répétition nécessaire des mesures instantanées permet une estimation approchée du danger possible. Mais la situation peut changer très rapidement, et à aucun moment on ne dispose d'un signal permettant de dire qu'on a franchi le seuil au-delà duquel la bilirubine nouvellement formée va diffuser dans les cellules cérébrales.

Le nombre des facteurs qui gouvernent la diffusion de la bilirubine dans les cellules cérébrales est grand et on doute un peu de parvenir à les mesurer tous. Un cependant est essentiel : la liaison plasmatique entre la bilirubine libre et la sérum-albumine, forme de transport du pigment. En effet, il tient sous sa dépendance, et nous allons voir de quelle manière, la distribution de la bilirubine dans l'organisme.

A - LES PROPRIETES DE LA LIAISON PLASMATIQUE ALBUMINE - BILIRUBINE

1 - Nous avons vu que la bilirubine libre était transportée dans le plasma sous forme d'un complexe bilirubine - protéine. Par différentes techniques de centrifugation, d'ultrafiltration, de dialyse et d'électrophorèse (66, 178, 190, 206, 207, 215), il est établi que, dans les conditions physiologiques qui nous intéressent, la protéine vectrice est l'albumine du sérum (240). La liaison entre la protéine vectrice et le pigment est plus étroite chez l'homme que dans d'autres espèces animales (240).

2 - On peut supposer, avec ODELL (207), que bilirubine et albumine obéissent, dans leur liaison, à la loi générale d'action de masse. La possibilité

de fixation de deux molécules de bilirubine par une molécule d'albumine à pH 7,4 a été démontrée par MARTIN (178), confirmée par OSTROW et SCHMID (215) et les réactions de liaison peuvent être écrites (207) :

$$(1)\quad \frac{[Alb^{++}]\,[B^{-}]}{[+\,Alb - B]} = K_1$$

$$(2)\quad \frac{[+\,Alb - B]\,[B^{-}]}{[B - Alb - B]} = K_2$$

(K_1 et K_2 sont des constantes de dissociation , K_2 étant environ 4 fois plus grande que K_1.)

3 - On peut représenter, avec ODELL, le passage de la bilirubine à travers la membrane vasculaire, d'une part, la membrane cellulaire, d'autre part, comme obéissant à un gradient de diffusion dont la direction est fonction, en dernière analyse, de l'état de dissociation de la bilirubine de chaque côté de la membrane, plutôt que de la quantité totale de bilirubine de part et d'autre de celle-ci (207).

DISTRIBUTION DE LA BILIRUBINE DANS L'ORGANISME

Plasma	Liquides interstitiels	Cellules
ALB - B ⟷	ALB - B	PROT. - B
ALB^+ ⟷	ALB^+	$PROT.^+$
+	+	+
B^- ⟷	B^- ⟶	B^-

(D'après ODELL)

On voit quel rôle essentiel est attribué à l'albumine plasmatique, dans le maintien de la bilirubine libre, sous forme liée, non diffusible, dont l'issue dans les liquides interstitiels et les tissus est ainsi rendue impossible.

4 - De nombreux faits d'observation ou expérimentaux viennent à l'appui de cette conception de la répartition de la bilirubine dans l'organisme et du rôle de l'albumine.

a)- La constatation de la survenue possible, chez le prématuré, d'ictère nucléaire, pour des concentrations de bilirubine inférieures au taux critique de 180 à 200 mg/l, a attiré l'attention sur les capacités de fixation de l'albumine de ces enfants.

On a pensé à la possibilité d'une affinité moindre de l'albumine plasmatique du prématuré pour la bilirubine. Cette hypothèse, explorée in vitro, n'a pas été vérifiée (93).

Par contre, il semble que la diminu-

tion du taux de l'albumine plasmatique, fréquemment rencontrée chez le prématuré, intervienne. C'est ce que suggèrent les études menées in vitro et chez l'animal ; mais on manque, chez le nouveau-né humain, de données statistiques valables.

Il est établi, chez l'animal, que l'albumine exerce un rôle protecteur vis-à-vis des effets toxiques de la bilirubine sur la cellule hépatique ou cérébrale, les préparations de mitochondries ou l'animal entier (53, 60, 78, 93, 145, 197, 207, 212, 240).

L'injection d'albumine chez le rat Gunn élève de façon nette le taux de la bilirubine plasmatique (215, 240). Il s'agit d'une nouvelle répartition du pigment, le pool miscible total ne changeant pas, comme l'indique l'activité spécifique de la bilirubine marquée (197, 215).

On a pu montrer l'absence de neurotoxicité de la bilirubine libre, lorsqu'on l'injecte sous forme liée à l'albumine, en opposition aux dommages qu'elle exerce lorsqu'elle est administrée isolément; on a pu, de même, vérifier la possibilité, dans une certaine mesure, de déplacer le pigment diffusé dans le système nerveux central, vers le plasma (93, 197, 215, 269).

La détermination du taux de bilirubine après exsanguino-transfusion reflète bien ce rôle de rétention exercé par l'albumine. Il est, en effet, plus élevé que ne le commanderait une égale répartition, dans les différents espaces, de la bilirubine résiduelle. Il existe un phénomène de rebond, lié à l'accumulation de la bilirubine dans l'espace plasmatique, à partir du réservoir que constituent les espaces extra-vasculaires (60).

Aussi a-t-on envisagé son utilisation dans la prévention de l'ictère nucléaire, non pas tant isolément qu'associée à l'exsanguino-transfusion (151, 197, 212, 240, 269). On peut reprocher à cette

méthode deux inconvénients :

- L'un est le risque théorique d'accidents hypervolémiques à quoi pourrait conduire son administration (228) ;

- L'autre est qu'en augmentant la concentration plasmatique de la bilirubine, elle prive le clinicien du seul guide qui lui permette, jusqu'à présent, de décider de l'opportunité d'une exsanguino-transfusion (60, 91, 197, 212, 240).

L'immense avantage qu'offre cette technique est l'extraction d'une quantité de bilirubine supérieure à celle soustraite par simple exsanguino-transfusion.

b)- A l'opposé de ce rôle protecteur joué par l'albumine, on a pu montrer la nocivité de certaines conditions physico-chimiques qui bouleversent l'équilibre existant entre albumine et forme liée à l'albumine de la bilirubine libre, permettant ainsi la libération dans le plasma d'une bilirubine diffusible, qui pénètre dans les liquides interstitiels et dans les tissus.

SILVERMANN et ses collaborateurs (122, 245, 246) ont observé, dans un groupe de prématurés soumis à une prophylaxie antibactérienne par la Pénicilline et le Sulfisoxazole (Gantrisine*), une proportion plus élevée d'ictères nucléaires que dans un groupe témoin d'enfants traités par l'oxytétracycline ; ceci, alors que les maximums des taux de bilirubine atteints étaient plus élevés dans le second groupe que dans le premier. Ils discutent alors l'hypothèse du rôle toxique de la Pénicilline ou du Sulfixazole. La suppression de ce dernier s'accompagne d'une réduction significative du taux d'ictères nucléaires, confirmant sa responsabilité.

Les études théoriques de ODELL (205, 206), JOHNSON (141, 147), OSTROW, SCHMID, et DIAMOND (93, 215, 240) démontrent son mécanisme d'action et

la responsabilité possible d'autres anions organiques.

Ainsi, l'injection d'ions salicylés ou de Sulfixazole, chez le rat ou chez le cobaye, entraîne l'abaissement de la concentration plasmatique de la bilirubine (207, 237), augmente considérablement celle du pigment dans les cellules cérébrales (145). Ceci, à des doses voisines de celles qu'on peut observer en clinique et sans qu'interviennent des variations du pH plasmatique (91).

D'autres acides organiques faibles ont probablement le même rôle. Particulièrement remarquable serait celui des acides gras libres, dont le taux augmente au cours du jeûne. Ils seraient capables de déplacer la bilirubine de sa combinaison protéique, augmentant ainsi le risque d'encéphalopathie bilirubinique (182). Ceci est un autre argument en faveur d'une alimentation néonatale précoce, destinée à lutter contre l'hypoglycémie et à réduire le taux des acides organiques (249, 250, 275).

Il n'est sans doute pas indifférent que cet apport glucidique se fasse sous forme de galactose, de préférence au glucose, par exemple. L'intervention du galactose, à l'échelon de la cellule hépatique dans les mécanismes de glycuro-conjugaison, le suggère fortement (98, 166).

Il apparaît possible encore que certains dérivés héminiques (hématine, méthalbumine, par exemple) puissent réduire, en se fixant sur l'albumine, la quantité de bilirubine liée à celle-ci. On trouve là une explication possible au rôle aggravant de l'hémolyse (207), mais aussi la source de difficultés et d'erreurs techniques quand on tente d'évaluer la capacité de fixation de l'albumine.

Qu'ils soient d'origine endogène ou exogène, le mode d'action de ces composés est identique : ils déplacent la bilirubine de sa combinaison avec l'albumine, libérant une partie de la bilirubine libre, lui permettant de diffuser à travers

la membrane vasculaire dans les espaces extra- et intra-cellulaires, et en particulier dans le parenchyme cérébral.

c)- A côté de ce mécanisme de compétition au niveau des sites de fixation qu'occupe la bilirubine sur l'albumine vectrice, il faut envisager la possibilité de réduction du capital de fixation que représente cette dernière par modification de l'équilibre acido-basique du plasma.

On a pu, en effet, constater cliniquement et expérimentalement que l'existence ou la création d'une acidose plasmatique aggravait le risque d'encéphalopathie bilirubinique.

Chez le prématuré, une acidose, quelle qu'en soit l'origine - au cours d'un syndrome de détresse respiratoire, par exemple -, peut sans doute expliquer la survenue d'un ictère nucléaire, malgré des taux faibles de bilirubine (252).

In vitro, on a montré (210) que le pouvoir de déplacement exercé sur la bilirubine par les ions salicylés augmentait dans des conditions techniques où la seule variable est l'abaissement du pH.

De même, MARTIN a montré que la liaison albumine-bilirubine s'exerçait différemment quand les conditions de pH changent (178). C'est ainsi qu'à pH 7,4, 1 molécule d'albumine ne fixe plus que 1,9 molécules de bilirubine, tandis qu'elle en fixe 3 à pH 7,9. A un pH inférieur à 7,0, la dissociation est complète et la bilirubine n'est plus fixée sur l'albumine (152).

La capacité de fixation de la bilirubine libre est différente selon qu'on s'adresse à une solution aqueuse en tampon phosphate, ou à l'albumine en milieu sérique. La capacité théorique de fixation n'est pas atteinte, dans cette deuxième éventualité

(39). Cette réduction de la capacité de fixation de l'albumine en milieu sérique est probablement liée à la diminution des "sites de fixation" acceptant la bilirubine, du fait de leur engagement en milieu sérique avec d'autres constituants que la bilirubine.

Il est probable, d'une part que cet engagement se fait avec des constituants plasmatiques, pour lesquels cette liaison protéique représente une forme de transport, ceci indépendamment du pH, et, d'autre part que, dans les conditions physiologiques du pH plasmatique, certains acides organiques entrent en compétition avec la bilirubine, au niveau des mêmes sites de fixation.

Une hypothèse semblable peut être formulée pour expliquer le mécanisme de l'acidose plasmatique. Bien qu'on ignore l'interaction exacte de la liaison albumine-bilirubine à des pH variés, on peut penser que toute acidose plasmatique a pour conséquence d'augmenter la fraction lipophile de la bilirubine immédiatement diffusible.

Ainsi, malgré le caractère bas des taux sériques de bilirubine (25, 252), faussement rassurant, peut exister, dans ces conditions, un risque accru d'ictère nucléaire

En conclusion :

Les propriétés de la liaison albumine-bilirubine sont d'une extrême importance dans la physiopathologie de l'encéphalopathie bilirubinique des hyperbilirubinémies néonatales, par leur rôle dans la répartition de la bilirubine libre, seule diffusible.

Sur le plan pratique, on peut schématiser les choses :

La bilirubine libre, formée en excès, non métabolisée, s'accumule dans le plasma. Elle se fixe sur l'albumine, tant que la concentration ne dépasse pas un niveau critique, empiriquement fixé.

Au-delà, toute bilirubine arrivant en excès peut diffuser dans les espaces extra- et intra-cellulaires, en particulier dans le parenchyme cérébral.

Dès que les conditions physiopathologiques s'éloignent de la normale, l'estimation du taux de la bilirubine sérique devient insuffisante. En effet, la réduction de la capacité de fixation de l'albumine, qui peut être due à des causes très nombreuses, et fréquemment rencontrées, soit isolément, soit en association, dans les ictères de la période néonatale, entraîne une saturation plus rapide par la bilirubine libre et une diffusion plus précoce du pigment en excès, pour des taux de bilirubine inférieurs à ceux qui sont considérés comme dangereux.

A l'inverse, il est possible que certains taux élevés de bilirubine soient compatibles avec une conservation d'une capacité de fixation satisfaisante, permettant de faire face sans danger à un nouvel afflux de bilirubine.

B - INTÉRÊT D'UNE MÉTHODE DE MESURE DE LA CAPACITE RESIDUELLE DE FIXATION DE L'ALBUMINE POUR LA BILIRUBINE.

On conçoit l'intérêt d'une méthode qui permettrait, non pas de mesurer la capacité de fixation théorique de l'albumine du nouveau-né ictérique, mais de déterminer si la saturation est atteinte ou ne l'est pas. C'est-à-dire, en définitive, à partir de quel moment il y a danger immédiat ou prévisible à court terme de diffusion, donc survenue possible d'ictère nucléaire et nécessité de mettre en oeuvre une exsanguino-transfusion.

1 - Les méthodes de mesure de la saturation de l'albumine par la bilirubine.

Le point de départ des recherches dans ce do-

maine a été représenté par la constatation de l'interférence de la bilirubine dans la détermination du taux de la sérum-albumine par certaines techniques utilisant un colorant.

a)- A la recherche de méthodes de dosage de l'albumine du sérum, différentes de celles habituellement utilisées, certains auteurs ont proposé de s'adresser à la propriété de l'albumine de se lier à un indicateur coloré.

Tandis que HUGGINS et ses collaborateurs (135) faisaient appel à la Phénolsulfone-phtaléine (PSP), BRACKEN et KLOTZ (54) étudiaient une méthode utilisant le méthyl orange.

RUTSTEIN et INGENITO (227), quant à eux, proposaient un autre colorant, le carboxy-2-hydroxy-4'-azo benzène ou acide 2(4'-hydroxybenzène-azo) benzoïque (HBABA).

Des variantes de la méthode ont été proposées par WRENN et FEICHTMEIR (283), d'une part, MARTINEK (180), d'autre part.

L'existence d'une relation linéaire entre la concentration en sérum-albumine et la densité optique du mélange teinture-albumine permet, par une simple lecture au spectrophotomètre, de connaître le taux d'albumine plasmatique (227).

b)- Les protéines plasmatiques, autres que l'albumine, même introduites en excès, n'interviennent pas dans la réaction (135, 227). Par contre, certains constituants plasmatiques interfèrent avec la technique.

On a constaté, en effet, que la présence dans le plasma de bilirubine diminuait la quantité de colorant fixée, abaissant de manière artificielle l'albuminémie (39, 44).

WATERS et PORTER ont décrit une relation

inversement proportionnelle entre la quantité de colorant fixée (PSP) et la concentration sérique de bilirubine (268). Etudiant la capacité de fixation de la PSP par le sérum, ces auteurs ont constaté qu'elle était très faible, voire nulle, chez des enfants nouveau-nés ictériques présentant des signes d'ictère nucléaire (269).

Par conséquent, si la détermination de l'albuminémie plasmatique, grâce à la liaison établie par l'albumine avec un colorant, est faussée par l'interférence de la bilirubine (et d'autres facteurs) avec la technique, l'intervention de ce pigment dans la réaction paraissait pouvoir être mise à profit dans l'appréciation de l'état de saturation de l'albumine par ou vis-à-vis du pigment.

Des raisons techniques - quantité importante de sérum nécessaire, nécessité d'une dialyse prolongée pendant deux heures - ont fait préférer à la méthode s'adressant à la PSP, une technique utilisant l'HBABA (180, 227, 283).

2 - Principe de mesure de la capacité résiduelle de fixation de l'albumine par l'acide 2(4'-hydroxybenzène-azo)benzoïque (HBABA).

L'application de la méthode de dosage de la sérum-albumine par l'HBABA (227) à l'appréciation de l'état de saturation de l'albumine par la bilirubine a été particulièrement étudiée par JOHNSON (269), d'une part, et par PORTER et WATERS (218), d'autre part. Ces derniers auteurs ont comparé cette méthode avec la technique utilisant la fixation de la PSP, dont ils avaient l'expérience.

La méthode est basée sur le changement caractéristique du spectre d'absorption de la teinture en solution aqueuse, quand des quantités croissantes d'albumine sont ajoutées (218, 227, 269).

En milieu non albumineux, l'HBABA a une absorp-

tion maximum à 350 mμ. Quand on ajoute de l'albumine, il apparaît une diminution de la densité optique (D.O.) à 350 mμ et une augmentation vers 405 mμ (218).

La différence entre les densités optiques de la solution d'HBABA-albumine et de la solution d'HBABA mesure la capacité de fixation du colorant par l'albumine. Elle varie de façon directement proportionnelle à la concentration d'albumine (39, 218, 227). Le dosage est possible en présence d'un excès de colorant (227).

L'addition de bilirubine à la solution d'HBABA ne change pas les caractéristiques spectrales de la teinture (269).

Par contre, l'addition de bilirubine au mélange HBABA-albumine se traduit par une diminution de la densité optique, exprimant une réduction de la fixation de l'HBABA (218).

En effet, la bilirubine déplace l'HBABA de sa combinaison avec l'albumine. Par contre, l'HBABA, même en excès, ne déplace pas la bilirubine de sa combinaison, en raison de l'affinité plus grande de cette dernière pour l'albumine (269).

Les effets du pH sur la réaction sont ceux qu'on pouvait théoriquement prévoir. A pH bas (7,0 à 7,2), la fixation de l'HBABA est augmentée (dissociation albumine-bilirubine). A pH élevé (7,6 à 7,8), la fixation de l'HBABA est diminuée (combinaison albumine-bilirubine). Mais la détermination varie de moins de 10 % entre pH 7,2 et pH 7,4 (218).

L'addition d'ions entrant en compétition avec la bilirubine se traduit par une diminution dans la fixation de l'HBABA (218).

- V -

NOTRE ETUDE

A - MATERIEL.

Nous avons étudié 100 sérums.

1 - D'une part, 69 sérums, prélevés chez 47 enfants, hospitalisés dans le service du Docteur GRENET (Hôpital Hérold).

Ces sérums ont été prélevés pour la plupart par nous-même, par ponction d'une veine superficielle de la main, du pied, du pli du coude ou d'une épicrânienne. Pour quelques-uns, l'échantillon étudié a été recueilli au début d'une exsanguino-transfusion par un des médecins transfuseurs (*) du Centre départemental de Transfusion sanguine, service de la maladie hémolytique du nouveau-né.

Le sang était recueilli sur tube hépariné et immédiatement centrifugé. Le sérum était séparé alors du culot globulaire et recueilli dans un tube à hémolyse.

Lorsque le dosage n'était pas effectué immédiatement, le sérum était congelé à -15° et conservé, à l'abri de la lumière, au congélateur, jusqu'à l'examen, ainsi qu'il est indiqué par PORTER et WATERS (218).

(*)- Nous les remercions ici de leur aide précieuse.

Ces échantillons provenaient d'enfants porteurs d'un ictère néonatal. Treize étaient des nouveau-nés à terme, et trente-quatre, des prématurés. Parmi ces derniers, 5 ont un poids de naissance inférieur à 1.500 g, 7 ont un poids compris entre 1.500 et 2.000 g, 13 entre 2.000 et 2.500 g, 9 entre 2.500 et 3.000 g. Aucun d'entre eux n'a fait d'ictère nucléaire.

Les étiologies des ictères rencontrés ont été les suivantes :

- Ictère par incompatibilité Rh : 1.
- Ictère par incompatibilité ABO : 4.
- Ictère par immaturité : 42, dont 3 chez des enfants de mère diabétique.

Une réserve doit être faite pour le dernier groupe ; il est possible que s'y dissimule un faible nombre d'incompatibilités ABO mineures, le groupe de l'enfant et celui de la mère n'étant pas connu dans toutes les observations de ce groupe.

2 - D'autre part, 31 sérums, qui nous ont été procurés par le Centre départemental de Transfusion sanguine (Pr. DAVID)(*), Service de la Maladie hémolytique et des Ictères du nouveau-né.

Ces sérums proviennent de sang prélevés, soit au cours des vérifications de taux élevés de bilirubine, demandées au C.D.T.S., soit au début d'exsanguino-transfusions, soit encore pour les contrôles ultérieurs.

Ils ont été séparés par centrifugation, conservés au réfrigérateur (+4°) pendant un délai inférieur à 24 heures.

Ils sont de provenance diverse ; leur caractère commun est d'avoir un taux de bilirubine supérieur à 200 mg/l.

(*)- Nous remercions bien vivement ici le Pr. DAVID et le Dr. PINON, qui nous ont permis l'accès à ce précieux matériel et nous ont ainsi aidé dans ce travail.

B- METHODES

1 - Pour chacun des sérums étudiés, nous avons réalisé une mesure de la capacité de fixation du sérum par l'HBABA.

Pour chacun des sérums de la deuxième série, nous avons effectué, chaque fois que la quantité de sérum disponible l'a rendue possible, une détermination du taux des protides, par la méthode du biuret (réactif de GORNALL). Cette détermination n'a été faite que sur quelques échantillons de la première série.

2 - La technique utilisée pour le dosage de la capacité de fixation du sérum par l'HBABA est celle décrite par PORTER et WATERS (218).

Réactifs

Une solution-mère est préparée en dissolvant 120 mg d'HBABA dans 500 ml d'une solution de soude centinormale.

Une solution-fille est préparée, à partir de cette solution-mère, en diluant 150 ml de cette dernière dans 300 ml d'eau distillée. On ajoute 10 ml de tampon Tris molaire, en ajustant le pH avec de l'acide chlorhydrique à 7,4. Le volume final est amené à 500 ml avec l'eau distillée.

Une solution tampon est préparée en ajoutant 10 ml de tampon Tris à 450 ml d'eau distillée. On ajusta le pH à 7,4 et on complète avec l'eau distillée à 500 ml.

Les solutions sont conservées au réfrigérateur. La solution-fille est utilisée 48 heures après sa préparation et renouvelée au bout d'un mois.

Dosages

On prépare 3 tubes (1), (2) et (3) :

- Le premier contient 3 ml de la solution d'HBABA et 0,1 ml d'eau distillée : il sert de témoin-actif.

- Le second contient 3 ml de la solution tampon et 0,1 ml du sérum à étudier : il sert de témoin-sérum.

- Le troisième contient 3 ml de la solution d'HBABA et 0,1 ml du sérum à étudier : c'est le dosage.

Le contenu de chaque tube est agité, transféré dans les cuves d'un spectrophotomètre Jouan (Senior).

La lecture est faite à 510 mμ, 2 à 5 minutes après l'addition de l'échantillon à la teinture. Le zéro est fait sur l'eau distillée.

Le résultat du dosage est la différence :

$$D = D.O.(3) - D.O.(2) + D.O.(1)$$

Expression des résultats

Pour des raisons sur lesquelles nous reviendrons, nous nous sommes adressé, dans l'expression de nos résultats, à un étalonnage réalisé, non comme PORTER et WATERS (218), à partir de solutions standards d'albumine à 10, 20, 30, 40 g o/oo, mais à partir d'un sérum humain témoin. En voici la composition électrophorétique en protides : Protides totaux : 72 g o/oo ; Albumine : 45,5 g o/oo ; α_1-globulines : 2 g o/oo ; α_2-globulines : 4 g o/oo; β-globulines : 9,5 g o/oo ; γ-globulines : 11 go/oo.

Notre courbe étalon a été réalisée en mesurant la capacité de fixation de ce sérum à des dilutions croissant de 0,1 en 0,1, depuis le sérum entier jusqu'à 0,1, selon la technique indiquée ci-dessus.

Elle est obtenue en portant (FIGURE 2) :

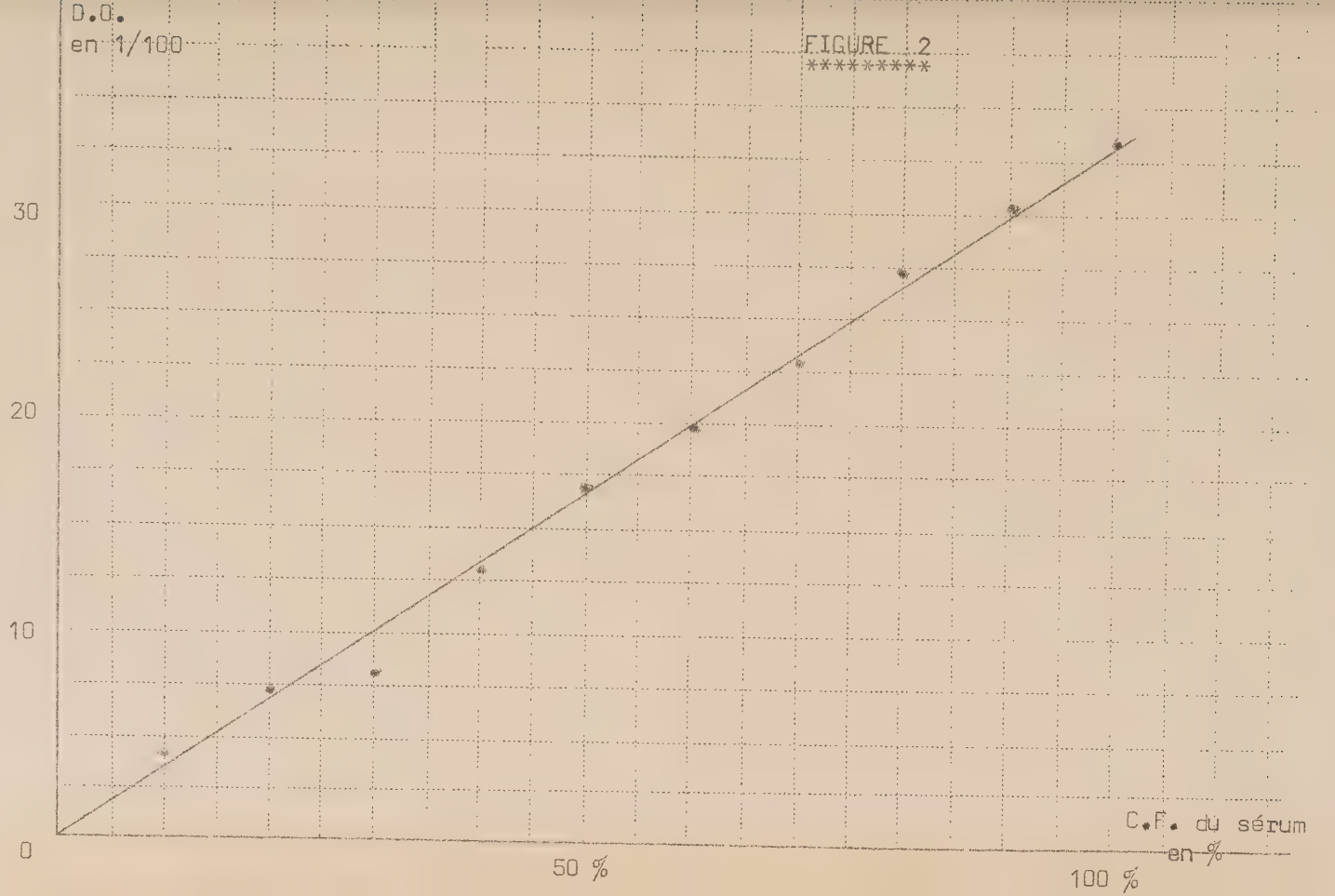


FIGURE 2
****

- en ordonnées, les déviations optiques en 1/100 (Moyenne de 3 mesures) ;

- en abscisses, la capacité de fixation du sérum, exprimée, pour chaque dilution, en % de la capacité de fixation du sérum entier (100 %).

La courbe ainsi tracée est une droite passant par l'origine (FIGURE 2).

Les résultats sont exprimés de la façon suivante :

La densité optique mesurée par le dosage est portée sur l'axe des ordonnées ; on lit directement sur l'axe des abscisses, la capacité de fixation du sérum étudié, en % de la capacité de fixation du sérum entier (contenant 45 g o/oo d'albumine).

3 - Les chiffres du taux de bilirubine sont :

- Dans la première série, ceux mesurés par la Pharmacie de l'Hôpital Hérold (Technique de JENDRASSIK en tampon caféiné).

- Dans la deuxième série, ceux du C.D.T.S. (Technique de MALLOY et EVELYN).

C - RESULTATS.

Ils sont rassemblés dans le Tableau I.

D - COMMENTAIRES.

1 - Nous nous sommes heurté à une première difficulté dans l'étalonnage.

a)- Afin de dresser une courbe étalon, nous nous sommes adressé à des solutions d'albumine dans du sérum salé à 9 ‰, aux concentrations croissantes de 10, 20, 30, 40 et 50 g o/oo.

Nous avons étalonné successivement

ainsi :

- de l'albumine humaine cristallisée (Lot 595),
- de l'albumine bovine cristallisée (N.B.C.),
- la solution d'albumine du C.N.T.S. à 17,5 %.

b)- Les courbes obtenues ont été très différentes d'une albumine à l'autre. Pour une même concentration d'albumine, les densités optiques obtenues - donc les capacités de fixation mesurées - sont très éloignées. Ainsi, pour une concentration d'albumine de 20 g o/oo, les densités optiques mesurées ont été, dans l'ordre, pour les trois préparations d'albumine : 15, 7, 10, donc des variations considérables de la capacité de fixation, près de 15 % entre l'albumine humaine et l'albumine bovine.

c)- En étudiant la littérature, nous avons constaté que ces difficultés avaient déjà été rencontrées.

En effet, BLONDHEIM (39), étudiant la fixation de la PSP par l'albumine humaine et l'albumine bovine en solutions salines, a constaté que celle-ci était inférieure à celle de dilutions de sérum humain, de concentrations identiques en albumine, et différentes d'une albumine à l'autre. Il a suggéré que cette différence de comportement pouvait être liée aux différences de préparation et de conservation des albumines du commerce.

Dans ses recommandations pour l'utilisation d'un standard de bilirubine, le Comité pour le foetus et le nouveau-né de l'Académie américaine de Pédiatrie (73) conseille d'utiliser, non des solutions de protéines artificiellement tamponnées, mais de préférence un pool de sérum.

Enfin, JOHNSON et BOGGS, utilisant la méthode de mesure de la capacité de fixation par l'HBABA, ont pris pour référence un sérum étalon et non une solution artificielle de protéines (146).

d)- Ces différences sont importantes dans l'interprétation des résultats.

Il n'est pas indifférent de s'adresser pour l'étalonnage à un sérum et à ses dilutions dont on mesure la capacité de fixation, ou à plusieurs sérums "entiers", contenant les mêmes concentrations décroissantes d'albumine.

En effet, BLONDHEIM (39) a constaté, ce que nous avons nous-même vérifié, que, pour des dilutions de sérums ou pour des solutions d'albumine, la courbe des densités optiques est une droite passant par l'origine. Il existe une relation de type $y = ax$ entre densité optique (ou fixation) et concentration en albumine.

Par contre, les sérums "entiers" ne fixent pas le colorant au-dessous d'une certaine concentration critique. L'existence de cette concentration critique traduit l'occupation d'un certain nombre de sites de l'albumine du sérum total, accepteurs possibles du colorant, par des substances variées. Elles rendent ainsi une fraction b de l'albumine du sérum, impropre à la fixation du colorant. La courbe obtenue répond à une équation du type $y = ax - b$, et coupe l'axe des abscisses en un point correspondant à une concentration d'albumine voisine de 15 g o/oo.

Ainsi, le sérum, dont la concentration en albumine est supérieure à cette concentration critique, fixe la teinture en proportion directe de la quantité d'albumine en excès, tandis que des dilutions salines de sérum ou des solutions d'albumine fixent la teinture en proportion de leur concentration totale en albumine.

e)- Ceci introduit, à notre avis, deux types de difficultés :

La première est que, faute de pouvoir étalonner avec un éventail de sérums de concentra-

tions croissantes en albumine, on est conduit à utiliser les dilutions d'un sérum témoin. La question se pose alors de l'expression des résultats.

Doit-on les exprimer en % de la capacité de fixation du sérum entier, en fixant le zéro à l'origine des abscisses ?

Ou bien doit-on considérer que le zéro correspond au tiers environ de la fixation totale (15 g/l pour notre sérum, qui contient 45 g d'albumine/l) ?

Nous avons choisi d'exprimer les résultats en étalonnant la courbe à partir de l'origine des axes, suivant en cela PORTER et WATERS (218), JOHNSON et BOGGS (146, 270).

Ce choix établi, il convient de déterminer à partir de quel pourcentage on pourra parler de saturation. Dans le système que nous avons adopté, le chiffre de 33 % doit être retenu. JOHNSON et BOGGS ont adopté un chiffre voisin (36 %), au-dessus duquel ils n'ont pas observé de complications neurologiques (146). PORTER et WATERS ont proposé un chiffre inférieur, en se basant sur la comparaison de leurs résultats avec ceux obtenus par la technique de la PSP (218, 266 bis).

2 - Nous analyserons maintenant nos résultats.

a)- Nous les avons rassemblés :

- d'une part, dans le TABLEAU 1, où sont réunis taux de bilirubine, capacité de fixation et, le cas échéant, le taux de protides ;

- d'autre part, dans les FIGURES 3 et 4. Dans celles-ci, pour chaque sérum, le taux de bilirubine est porté en abscisses (mg/l) ; la capacité de fixation (en % par rapport à la capacité de fixation du sérum étalon), en ordonnées.

TABLEAU N° 1

RESULTATS

Noms	N° sérums	Taux de bilir. mg/l	Capacité de fixation %	Protides g/l
ADA. Valérie	1	222	82	
BAG. Catherine	2	131	82	
BAT. Franck	3	122	55	
BOUT. Marc	4	162	58	
BRA. François	5	135	34	
CAR. Antoinette	6	85	43	
(1)	7	110	46	
CHI. Jean-Pierre	8	120	65	
(2)	9	140	46	
COL. Laurent	10	145	56	
COU. Vincent	11	140	58	
(3)	12	202	40	
CZE. Didier	13	122	40	48
(4)	14	147	25	
DEF. Sylvie	15	143	31	76
DEP. Richard	16	187	34	65
(5)	17	225	22	
DES. Jean-Marc	18	212	37	
DES. Patricia	19	148	89	
(6)	20	147	68	
	21	85	65	

Noms	N° sérums	Taux de bilir. mg/l.	Capacité de fixation	Protides g/l
DON. Valérie	22	212	40 %	
DUR. Luc	23	93	65	
ESC. Laurence	24	170	12	51
GON. Hervé	25	154	86	
GOU. Frédéric	26	159	65	
GRY. Fabrice	27	141	38	
HAN. Christophe	28	125	22	
(7)	29	142	17	
HUA. Jean-Claude	30	135	54	
IOR. Jocelyne	31	136	86	
(8)	32	196	86	
LEB. Myriam	33	137	56	
LEB. Sylvain	34	192	65	55
(9)	35	212	65	
	36	68	86	61
LEF. Sandrine	37	188	92	
LON. Dominique	38	123	68	
MAR. Françoise	39	165	56	
(10)	40	152	64	
MAR. Virginie	41	118	58	
(11)	42	153	62	
MIC. Muriel	43	178	37	
MIC. Pascal	44	150	22	
MOR. Philippe	45	156	40	
(12)	46	198	34	
MOR. Véronique	47	202	71	69

Noms	N° sérums	Taux de bilir. mg/l.	Capacité de fixation	Protides g/l
(13)	48	130	71 %	
NAR. Bruno	49	188	33	
NEB. Agnès	50	170	37	
PIA. Valérie	51	103	65	
(14)	52	125	48	
PIC. Thierry	53	220	32	
(15)	54	112	68	
ROY. Suzanne	55	97	51	
RIC. Yann	56	98	65	
(16)	57	142	48	
	58	148	47	
	59	204	43	45
SAC. Antonio	60	184	56	
(17)	61	228	74	61
SAR. Nathalie	62	200	37	60
SCO. Thierry	63	228	83	
STE. Philippe	64	108	65	
TEM. Stéphane	65	116	43	49
VIE. Jean-Yves	66	86	74	
(18)	67	100	71	
WIE. Valérie	68	117	62	
YHO Marie-France	69	148	86	
ABR...	70	228	59	63
AMO...	71	225	8	65
BER...	72	202	37	75

Noms	N° sérums	Taux de bilir. mg/l.	Capacité de fixation	Protides g/l.
BLA...	73	222	33	86
BIO...	74	262	37	72
BOI...	75	206	40	50
BOL...	76	224	38	75
(19)	77	232	55	57
	78	258	38	57
	79	208	77	
BRA...	80	200	8	
CRO...	81	206	30	
(20)	82	240	33	77
DEV...	83	206	65	65
ETC...	84	266	37	65
(21)	85	282	45	63
FEI...	86	206	43	
FLO...	87	212	25	
GHA...	88	262	31	81
GIB...	89	218	8	66
HAL...	90	258	10	69
JOU...	91	225	22	76
LAM...	92	320	49	
MAH...	93	266	40	67
MOU...	94	218	22	48
PIM...	95	224	15	67
PIT...	96	202	65	67
ROU...	97	256	19	68
ROU...	98	293	16	66
ROY...	99	210	49	66
JOL...	100	202	15	55

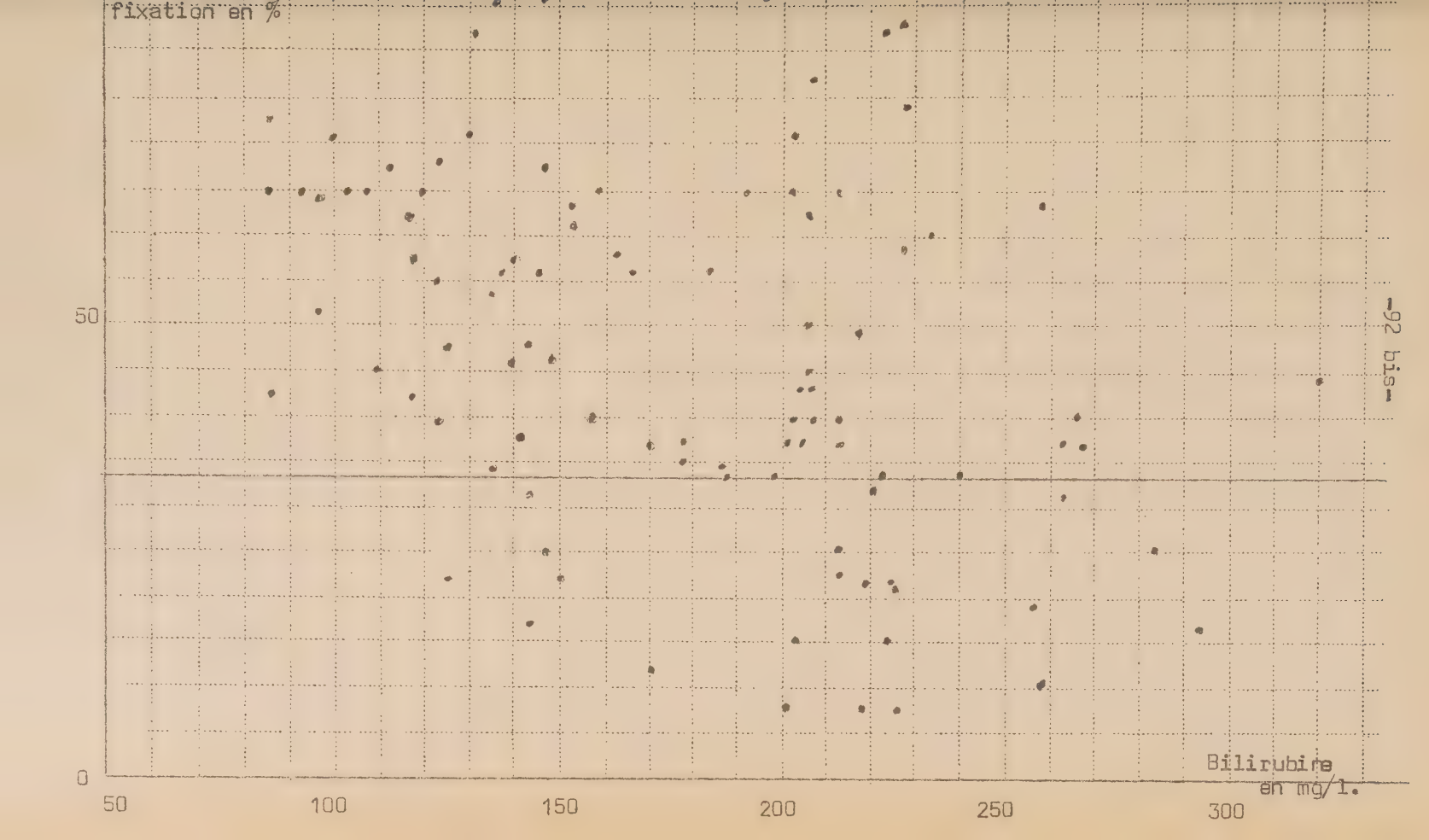
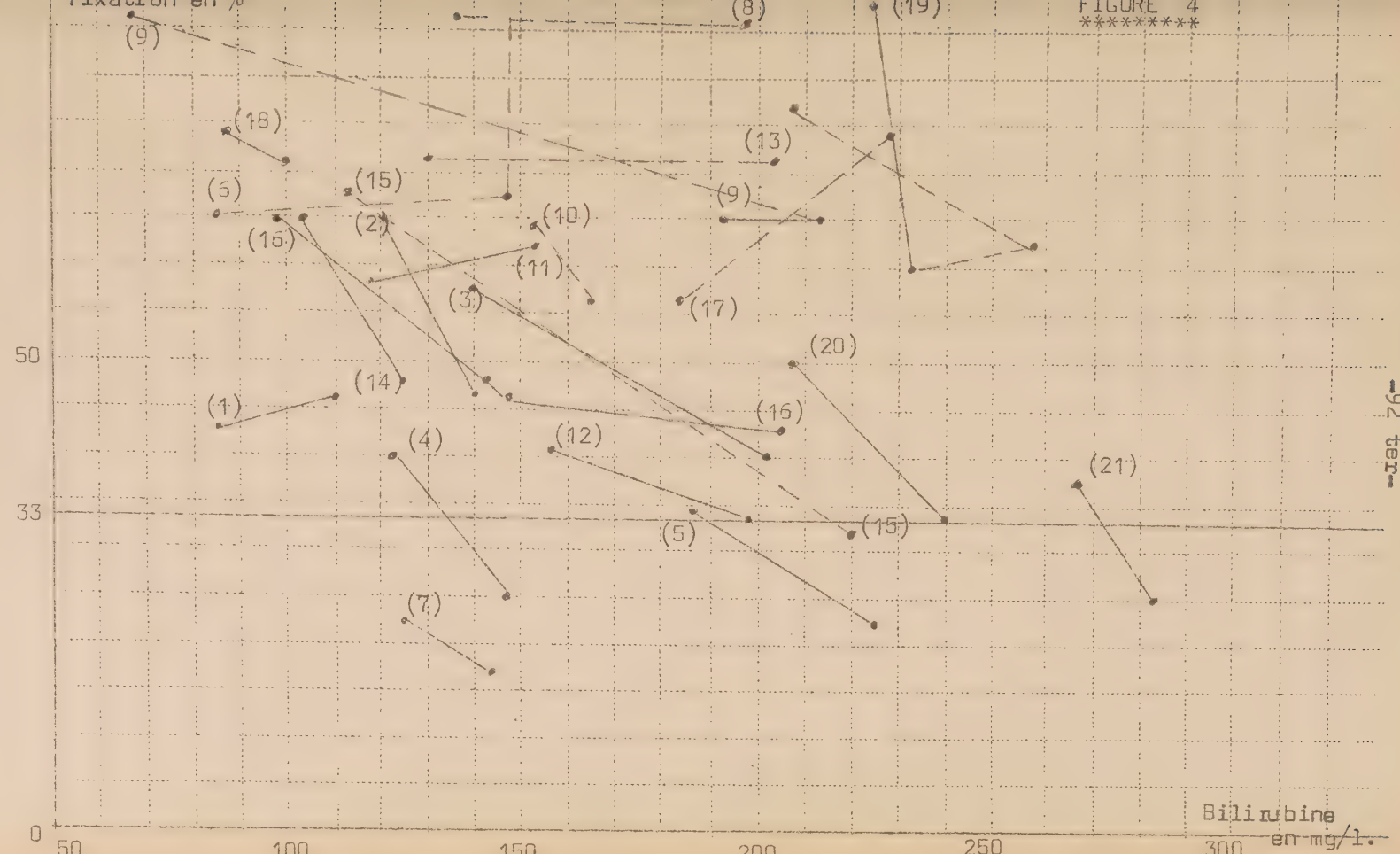

fixation en %
50
0
50
100
150
200
250
300
Bilirubine
en mg/l.

FIGURE 4
****


Fixation en %
50
33
0
50
100
150
200
250
300
Bilirubine en mg/l.
(9)
(8)
(19)
(18)
(13)
(5)
(15)
(9)
(2)
(10)
(16)
(11)
(3)
(17)
(20)
(14)
(1)
(16)
(4)
(12)
(21)
(5)
(15)
(7)

La FIGURE 3 rassemble les valeurs obtenues pour chaque sérum (100 mesures).

La FIGURE 4 tente de préciser l'évolution de la capacité de fixation dans les 21 cas où nous avons pu effectuer deux mesures ou plus chez le même enfant.

Nous avons tracé, pour chaque figure, la parallèle à l'axe horizontal passant par le point d'ordonnée 33 %, que nous avons choisi comme représentatif de la saturation.

b)- On peut observer (FIGURE 1) :

1- qu'il n'y a pas, comme on pouvait le prévoir, de relation linéaire entre le taux de bilirubine et la capacité résiduelle de fixation ;

2- que la répartition d'ensemble des points est grossièrement orientée selon un axe oblique en bas et à droite, de telle façon que :

- la plupart des valeurs basses de la bilirubinémie sont situées au-dessus de la ligne de saturation. En effet, on n'observe pas de saturation pour les taux inférieurs à 120 mg/l ;

- les taux de bilirubine supérieurs à 250 mg/l s'accompagnent de capacités résiduelles de fixation, ou très diminuées, ou nulles.

- Entre ces deux valeurs, la répartition est très hétérogène, et si on est surpris de trouver des capacités de fixation élevées pour certaines valeurs hautes des taux de bilirubine, à l'inverse, on constate qu'une bilirubinémie basse peut s'accompagner d'une capacité de fixation très diminuée.

Il n'existe pas, en tout état de cause, de valeur seuil de bilirubinémie, dans ces conditions.

c)- Nous avons pu, chez 18 enfants, étudier l'évolution dans le temps de la capacité de fixation (FIGURE 4, Courbes 1 à 18) :

1- Les courbes (2), (3), (4), (5), (7), (12), (14) et (16), en traits pleins, mettent en évidence la diminution de la capacité de fixation de l'albumine du sérum, chez des enfants, au cours de la phase d'ascension de la bilirubinémie.

Les mesures ont été pratiquées entre le 2me et le 6me jour ; les 3me et 5me jours, pour les courbes (2), (3) et (5) ; les 3me et 4me, pour la courbe (4) ; les 4me et 6me, pour les courbes (7) et (12) ; les 4me et 5me jours, pour la courbe (14) ; enfin, les 2, 3, 4 et 6mes jours, pour la courbe (16).

Une exsanguino-transfusion a été pratiquée chez l'enfant (3), au taux de 202 mg (CRF = 40 %), et l'enfant (5), au taux de 225 mg/l (CRF = 22 %).

Aucun ictère nucléaire n'a été observé chez les enfants (4), (5) et (7), dont les capacités résiduelles de fixation étaient basses : 25, 22 et 17 %.

On peut remarquer que :

- l'enfant (4) était un enfant de mère diabétique, porteur d'une acidose (pH = 7,16) à la naissance, et qui est décédé au 29me jour. L'autopsie n'a pas montré de lésions cérébrales.

- l'enfant (7) était un grand prématuré (P.N. : 1,200 kg), décédé au 11me jour d'immaturité.

- l'enfant (5) était en bon état neurologique à l'âge de deux mois.

Particulièrement digne d'intérêt est la courbe (16), pour laquelle 4 points ont été obtenus, et qui dessine bien l'évolution de la capacité résiduelle de fixation.

2- Les courbes (1), (11) -traits

pleins - et (10) - tirets - montrent une élévation de la capacité de fixation de l'albumine. Les mesures ont été faites les 3me et 6me jours (1), les 2me et 7me jours (11), alors que le taux de la bilirubine avait augmenté.

L'augmentation de (1) n'est pas considérable (43 à 46 %), et sans doute non significative, compte tenu de l'erreur possible sur la détermination du taux de bilirubine.

L'augmentation de (11) (58 à 62 %) est du même ordre, mais l'écart entre les chiffres de la bilirubine est plus important. Il faut sans doute tenir compte de la date de la deuxième mesure (au 7me jour) et des capacités accrues de glycuro-conjugaison.

Pour (10), l'élévation modérée de 56 à 64 % est contemporaine de l'abaissement au 6me jour (152 mg/l) de la bilirubine, qui se trouvait la veille à 185 mg/l.

3- Nous étudierons à part les courbes (6), (8), (9), (13), (15), (17) et (18).

La courbe (18) est particulière. Il s'agit des mesures de la capacité de fixation avant exsanguino-transfusions aux 2me et 4me jour pour incompatibilité Rh.

Les courbes (9), (13) et (15) représentent l'évolution de la capacité de fixation, mesurée avant et après exsanguino-transfusion, déclenchée aux taux de 212 (9), 202 (13) et 220 mg/l (15).

La capacité de fixation augmente de 65 à 86 % (9), 32 à 66 % (15), tandis qu'elle reste identique pour l'enfant (13), chez lequel existe une fixation particulièrement élevée avant exsanguino-transfusion (71 %), pour un taux de 202 mg/l de bilirubine.

La même fixation élevée est retrouvée aux deux mesures, les 2me et 3me jours, chez l'enfant (8), qui

est exsanguiné à 196 mg/l le 3me jour.

Chez l'enfant (17), les constatations faites semblent tout à fait anormales : l'augmentation, au cours de la même journée (17 h. : 184 ; 21 h. : 228 mg/l), du taux de bilirubine, paraît s'accompagner d'une élévation de la capacité de fixation de 56 à 74 %. Une erreur technique est-elle responsable de cette élévation paradoxale ?

A l'inverse, la courbe (6) fait apparaître une diminution de la capacité de fixation de 69 à 65 %, sans modification du taux de bilirubine (4me et 5me jours), et son maintien à 65 % au 6me jour, tandis que la bilirubinémie passe de 145 à 85 mg/l.

4- N'ayant pu disposer, dans cette série, que de très rares sérums dont les taux de bilirubine dépassaient 200 mg/l, nous avons étudié 31 sérums provenant du Centre départemental de Transfusion sanguine et répondant à cette condition.

Nous avons observé la même absence de relation linéaire entre taux de bilirubine et capacité résiduelle de fixation, une dispersion des résultats qui tend à diminuer vers les valeurs fortes de la bilirubinémie ; mais celles-ci sont trop peu nombreuses pour qu'on puisse en tirer des conclusions.

Nous avons pu observer l'évolution de la capacité de fixation chez 3 enfants (courbes (19), (20), (21)).

Dans les cas (20) et (21), il s'agit de deux mesures effectuées à des taux croissants de bilirubine avant exsanguino-transfusion. On constate une diminution de la capacité de fixation du sérum dans les deux cas.

La courbe (19) comporte 4 points chez un enfant porteur d'un céphalhématome sans incompatibilité. Les deux premiers ont été mesurés avant exsanguino-transfusion, le troisième après une première exsanguino-

transfusion, et le quatrième après la deuxième.

5- La constatation à plusieurs reprises de capacités résiduelles de fixation élevées, en particulier pour des valeurs de la bilirubinémie proches ou supérieures à 200 mg/l, nous a amené à nous demander s'il n'existait pas une cause d'erreur d'ordre technique majorant les résultats, ou s'il fallait faire entrer ces faits dans le cadre de ceux observés par LUCEY et ses collaborateurs (174).

Ceux-ci ont rapporté des taux paradoxalement élevés de fixation par le sérum d'enfants atteints d'ictère nucléaire, dont l'existence, si elle était confirmée, mettrait en cause la validité de la méthode.

Certes, d'autres hypothèses sont possibles :

- La technique utilisée (PSP) est différente et fait appel à une dialyse. Cependant, PORTER et WATERS (218, 266 bis, 268) ont étaoli leur échelle de valeurs par référence à cette technique.

- On connaît la possibilité, après diffusion du pigment au cours de l'encéphalopathie bilirubinique, d'abaissement rapide du taux de bilirubine. Il est possible qu'un nouvel équilibre de diffusion étant atteint, la capacité de fixation de l'albumine se trouve augmentée. Cette explication ne peut être retenue dans nos cas, où nous n'avons pas observé d'ictères nucléaires.

Nous nous sommes demandé si ces capacités élevées de fixation ne s'observaient pas uniquement dans certains sérums conservés au congélateur et dont certaines propriétés pouvaient se trouver modifiées (turbidité, dénaturation des protéines). La vérification à laquelle nous nous sommes livré nous a donné des résultats comparables avant et après congélation, y compris pour les sérums à capacité de fixation élevée. L'écart entre les mesures est de l'ordre de 2 à 3 %.

Nous avons écarté les sérums obtenus dans des conditions difficiles de prélèvement, afin d'éliminer toute cause d'erreur due à une éventuelle hémolyse.

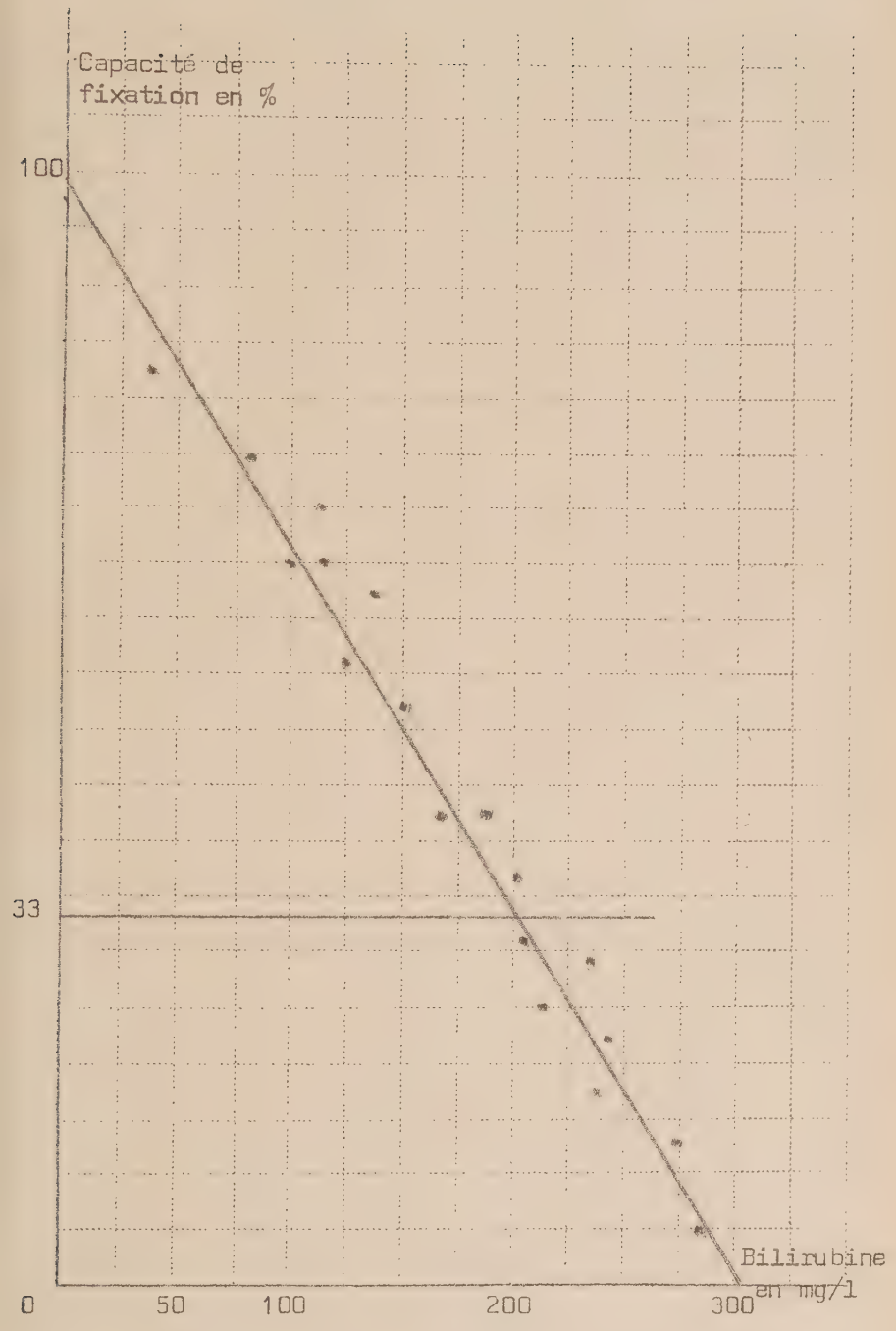
Nous avons également vérifié qu'il ne s'agissait pas de modifications liées à une exposition accidentelle à la lumière.

Aussi, dans l'état actuel des choses, nous pensons que ces fixations élevées ne sont pas les conséquences d'une erreur technique. Il nous paraît important de souligner que, dans les cas (8) et (9), où la capacité de fixation a été mesurée à 24 heures d'intervalle, elle reste élevée, malgré l'ascension de la bilirubinémie.

A quoi correspondent ces fixations élevées ? Si on les compare aux taux de protides, on constate qu'elles ne sont pas obligatoirement le fait de sérums à protidémie élevée. Traduisent-elles une aptitude particulière de la bilirubine à fixer l'HBABA ? L'HBABA et la bilirubine ? Ou bien sont-elles le reflet d'un défaut de fixation de la bilirubine par l'albumine du sérum ?

Il nous est impossible de fournir une réponse à ces questions. Quand on tente, comme nous l'avons fait, de saturer un sérum témoin par des quantités croissantes de bilirubine, on obtient pour un sérum donné une saturation. Pour notre sérum témoin (45 g d'albumine/l), la droite obtenue coupe l'axe des abscisses vers 310 mg/l et atteint les 33 % de la saturation vers 210 mg/l (FIGURE 5).

Cet aspect inattendu, rencontré au cours de l'étude de la capacité de fixation de la sérum-albumine dans certains sérums de nouveau-nés ictériques, conduit à faire quelques réserves sur son utilisation, comme seul critère d'intervention en vue d'exsanguino-transfusion, à la place du taux de la bilirubine sérique, ainsi qu'il a été proposé (218, 266 bis, 268).


Capacité de
fixation en %
100
33
0
50
100
200
300
Bilirubine
en mg/l

D'autres études nous paraissent être nécessaires, pour déterminer la place exacte que peut prendre cette méthode, séduisante dans son principe, dans l'arsenal des moyens destinés à lutter contre l'ictère nucléaire.

C O N C L U S I O N S

I/ - L'intérêt théorique qu'il y a à étudier la capacité résiduelle de fixation de la sérum-albumine pour la bilirubine, chez les nouveau-nés atteints d'ictère hyperbilirubinique, est réel.

- Le danger commun de ces ictères, quelle qu'en soit l'étiologie, est représenté par la possibilité de survenue d'une encéphalopathie bilirubinique. Celle-ci est la conséquence de l'accumulation intra-cérébrale de la bilirubine libre, qui se comporte comme un poison cellulaire.

- Trois composantes apparaissent essentielles dans la physiopathologie de cette complication redoutable. Elles doivent toutes trois être prises en considération, dans les tentatives qui sont faites d'en assurer la prévention.

1 - La première est l'accumulation dans l'organisme de bilirubine en excès, par le double mécanisme d'une production exagérée de pigment et d'un défaut de conjugaison hépatique, diversement associés.

Le premier mécanisme domine dans les ictères par hémolyse dus à une incompatibilité de groupe. Le second est au premier plan dans l'ictère dit physiologique du nouveau-né et dans l'ictère du prématuré. On le désigne par le vocable commode d'immaturité hépatique. On admet qu'il s'agit d'une inhibition transitoire du système de glycuroconjugaison de la bilirubine libre, dont on connaît

des déficits permanents. Un point paraît important: le rôle probable, dans ce blocage, du système de détoxication de la bilirubine, des conditions de fonctionnement cellulaire hépatique, particulières au nouveau-né, qu'une alimentation précoce pourrait peut-être améliorer.

2 - La deuxième composante est la perméabilité de la barrière hémocérébrale. La même notion d'immaturité est invoquée à son niveau, pour expliquer la perméabilité, chez le nouveau-né, d'une structure qui s'opposera, passé la période néonatale, à la diffusion de la bilirubine libre dans le parenchyme cérébral.

Son rôle est extrêmement important, dans la mesure où les conditions de sa perméabilité sont très variables et sont augmentées dans diverses circonstances pathologiques de fonctionnement, comme l'acidose, l'anoxie, l'hypoglycémie. Ces variations de la perméabilité capillaire sont sans doute responsables des complications cérébrales de certaines hyperbilirubinémies modérées.

3 - La troisième composante, qui fait le lien entre les deux précédentes, est représentée par la liaison plasmatique de la bilirubine libre avec la sérum-albumine.

Celle-ci joue un rôle capital dans la répartition de la bilirubine libre dans les différents secteurs de l'organisme.

Elle en réalise la "neutralisation", en la retenant dans l'espace vasculaire, ce qui interdit sa diffusion dans le parenchyme cérébral. Ce captage exercé par l'albumine peut être perturbé de différentes façons. La diminution de la concentration de l'albumine du sérum, le déplacement de la bilirubine de sa combinaison avec l'albumine au cours du jeûne, de l'acidose, de l'accumulation de dérivés héminiques, ou de certaines substances exerçant un effet compétitif, aboutissent à une réduction

de la capacité de fixation de l'albumine, à une saturation plus rapide des "sites" acceptant la bilirubine, à une accumulation de bilirubine non liée et disponible pour pénétrer les cellules cérébrales.

- Les efforts de prévention de l'ictère nucléaire sont naturellement engagés dans ces trois directions. On essaie de percer le mécanisme de la glycuro-conjugaison, le fonctionnement de la barrière hémo-cérébrale. On tente d'en faciliter ou d'en renforcer les effets, en améliorant les conditions nutritionnelles, en luttant contre l'acidose et l'hypoglycémie. On s'efforce de réduire l'hyperbilirubinémie par différents procédés thérapeutiques, dont le plus intéressant, de loin, est la photothérapie.

En ce qui concerne "l'étape plasmatique", l'appréciation du taux de bilirubine sérique rend mal compte de l'état d'équilibre créé par la liaison plasmatique albumine-bilirubine, et du danger réel de l'hyperbilirubinémie.

Sa mesure, techniquement délicate, est pourtant le seul guide actuellement utilisable. La comparaison du résultat obtenu avec un taux critique, empiriquement fixé et voisin de 200 mg/l, permet de déclencher le seul geste efficace devant une hyperbilirubinémie menaçante : l'exsanguino-transfusion.

L'intérêt de l'étude des moyens permettant d'évaluer la capacité résiduelle de fixation de l'albumine du sérum, au cours des ictères hyperbilirubiniques, est donc indiscutable.

II/ - Nous avons tenté d'étudier l'intérêt pratique d'une telle méthode, proposée par PORTER et WATERS (218) et par JOHNSON (269), et utilisant la fixation sur l'albumine d'un colorant, l'HBABA.

Nous nous sommes heurté à certaines difficultés, avec le matériel d'étude, l'étalonnage de

la courbe de référence et l'interprétation des résultats.

Nous avons étudié 100 sérums, répartis en deux séries :

- l'une de 69 sérums, provenant de 57 nouveau-nés ictériques et dont les taux de bilirubine vont de 68 mg/l à 218 mg/l ;

- l'autre de 31 sérums, recueillis grâce au Centre départemental de Transfusion sanguine et dont les taux de bilirubine vont de 200 mg/l à 320 mg/l.

Résultats :

Nous pensons pouvoir, de leur étude, tirer les conclusions suivantes :

La méthode de dosage de la capacité résiduelle de fixation de la sérum-albumine par l'HBABA est une méthode de réalisation technique aisée.

Elle n'exige qu'un minimum de sérum, ce qui autorise les microprélèvements et permet la répétition de la mesure chez le nouveau-né, avantages particulièrement précieux dans la surveillance de l'évolution de l'hyperbilirubinémie.

Elle ne nécessite qu'un minimum de manipulations, une lecture simple au photomètre.

Elle paraît apporter des renseignements fidèles, reproductibles dans les conditions de la mesure, sur l'état de saturation de l'albumine. La capacité résiduelle de fixation ainsi mesurée est indépendante du taux de la bilirubine sérique. Particulièrement intéressants apparaissent les cas où la capacité de fixation s'avère faible, tandis que le taux de bilirubine sérique est bas.

Il n'est cependant pas question de songer à remplacer des critères ayant fait leur preuve

de réelle efficacité dans la plupart des cas par une méthode dont la valeur ne peut être dégagée qu'après une étude à terme, portant sur de nombreux cas d'ictères hyperbilirubiniques, et permettant la comparaison des résultats de cette mesure, des taux de bilirubine et de l'évolution neurologique.

Il nous paraît possible cependant de proposer :

- d'associer à la mesure du taux de bilirubine une détermination par l'HBABA de la capacité résiduelle de fixation de l'albumine et une mesure du taux de protides ;

- d'adopter l'attitude thérapeutique suivante :

L'exsanguino-transfusion au taux classique de 200 mg/l reste la règle.

Dans les cas où le taux de protides est bas, la capacité de fixation faible, malgré un taux bas de bilirubine, l'exsanguino-transfusion doit être discutée.

Dans les cas où le taux de protides est normal, la capacité de fixation élevée, le chiffre de 200 mg/l peut être franchi sans intervenir, en surveillant attentivement, de façon répétée, le taux de bilirubine et la capacité de fixation.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Le Recteur de l'Académie
de Paris,
J. ROCHE

Le Doyen de la Faculté
de Médecine,

G. BROUET

Le Président
de la thèse,

R. LAPLANE

B I B L I O G R A P H I E

1- ABELSON N.M., BOGGS T.R.- Plasma pigments in erythroblastosis fetalis. I- Spectrophotometric absorption patterns.- Pediatrics, 1956, 17, 452.

2- AICARDI J.- Hyperbilirubinémie indirecte et occlusions néonatales.- Arch. Franç. Pédiat., 1963, 20, 839.

3- AIDIN R., CORNER B., TOVEY G.- Kernicterus and prematurity.- Lancet, 1950, 1, 1153.

4- ALAGILLE D.- Les ictères métaboliques de la période néo-natale.- Ann. Biol. Clin. (Paris), 1966, 24, 3.

5- ALAGILLE D., KREMP P.- Les ictères du nouveau-né en dehors de l'incompatibilité foeto-maternelle. Données statistiques.- Rev. Int. Hépat., 1964, 14, 539.

6- ALISON F., MARIE L.- La prévention de l'ictère nucléaire chez le prématuré (en dehors de l'incompatibilité sanguine foeto-maternelle).- Ann. Pédiat., 1966, 42, 363/115.

7- ALLEN F.M., DIAMOND L.K., VAUGHAN V.C.- Erythroblastosis fetalis : prevention of kernicterus.- Amer. J. Dis. Child. 1950, 80, 779.

8- ALLEN D.T., KORNHAUSER D., SCHWARTZ R.- Glucose homeostasis in the newborn puppy.- Amer. J. Dis. Child., 1966, 112, 343.

9- ARIAS I.M.- The chemical basis of kernicterus.- Advances Clin. Chem., 1960, 3, 35.

10- ARIAS I.M.- Recent advances in the metabolism of bilirubin and their clinical implications.- Pediat. Clin. N. Amer., 1960, 44, 607.

11- ARIAS I.M.- Chronic conjugated hyperbilirubinemia with increased production of bile pigments not derived from hemoglobin of nature circulating erythrocytes.- J. Clin. Invest. 1962, 41, 1341.

12- ARIAS I.M.- Chronic unconjugated hyperbilirubinemia without overt signs of hemolysis in adolescents and adults.- J. Clin. Invest., 1962, 41, 2233.

13- ARIAS I.M., GARTNER L., FURMAN M., WOLFSON S.- Studies on effect of several drugs on hepatic glucuronide formation in newborn rats and humans.- Ann. N.Y. Acad. Sci., 1963, 111, 274.

14- ARIAS I.M., GARTNER L., SEIFTER S., FURMAN M.- Neonatal unconjugated hyperbilirubinemia associated with breast-feeding and a factor in milk that inhibits glucuronyl formation in vitro.- J. Clin. Invest., 1963, 42, 913 (Abst.).

15- ARIAS I.M., GARTNER L., SEIFTER S., FURMAN M.- Prolonged neonatal unconjugated hyperbilirubinemia associated with breast feeding and a steroid pregnane 3 (α) 20 (β) diol in maternal milk that inhibits glucuronyl formation

in vitro.- J. Clin. Invest., 1964, 43, 2037.

16- ARIAS I.M., JOHNSON L., WOLFSON S.- Biliary excretion of injected conjugated and unconjugated bilirubin by normal and Gunn rats.- Amer. J. Physiol., 1961, 200, 1091.

17- ARIAS I.M., LONDON I.M.- Bilirubin glucuronide formation. In vitro demonstration of a deficit in Gilbert's disease.- Science, 1957, 126, 563.

18- ARIAS I.M., SCHORR J.B., FRAAD L.M.- Congenital hypertrophic pyloric stenosis with jaundice (Clinical conference).- Pediatrics, 1959, 24, 338.

19- ARIAS I.M., WOLFSON S., LJOEY J.F., MAC KAY R.J., Jr- Transient familial neonatal hyperbilirubinemia.- J. Clin. Invest., 1965, 44, 1442.

20- BACOLA A., BEHRLE F.C., de SCHWEINITZ L., MULLER H.C., MIRA M.- Perinatal and environmental factors in late neurologic sequelae.- Amer. J. Dis. Child. 1966, 112, 359 et 1966, 112, 369.

21- BADOUAL J.- Les ictères à bilirubine libre de la période néonatale.- Presse Méd., 1966, 74,1753.

22- BAENS G.S., LUNDEEN E., CORNBLATH M.- Studies in carbohydrate metabolism in the newborn infant. VI- Levels of glucose in blood in premature infants.- Pediatrics, 1963, 31, 580.

23- BAMATTER F., JEANDET J., HAMPAI A.- L'ictère "physiologique" néonatal.- Rev. Int. Hépat., 1960, 10, 3.

24- BAMATTER F., VARONIER H.S.- Ictère non hémolytique congénital avec ictère nucléaire.- Schweiz.

Med. Wschr. 1962, 92, 111.

25- BARLOW C.F.- Clinical aspects of the blood-brain barrier.- Ann. Rev. Med., 1964, 15, 187.

26- BARTON M.E., WILSON J., WALKER W.- Idiopathic jaundice in premature infants.- Lancet, 1962, 2, 847.

27- BENNHOLD H.- Uber die Vehikelsfunktion der Serumeiweisskörper.- Ergebn. Inn. Med. Kinderheilk. 1932, 42, 273.

28- BERENSOHN S., LOWMAN J., SONBERG D., WATSON C.J.- Idiopathic dyserythropoïetic jaundice.- Blood, 1964, 24, 1.

29- BERNARD R., GARRIGUES A., ROUBY D.- La barrière hémo-cérébrale et sa perméabilité aux corticoïdes.- Ann. Pédiat., 1966, 42, 2109/505.

30- BERNSTEIN J., LANDING B.H.- Extraneural lesions associated with neonatal hyperbilirubinemia and kernicterus.- Amer. J. Path. 1962,40,371.

31- BERNSTEIN L.H., BEN EZZER J., GARTNER L., ARIAS I.M.- Hepatic intracellular distribution of tritium labeled unconjugated and conjugated bilirubin in normal and Gunn rats.- J. Clin. Invest., 1966, 45, 1194.

32- BICKEL H., LINNEWEH F.- Austauschtransfusion als prophylaktische Massnahme beim Kernikterus Frühgeborener.- Klin. Wschr. 1957, 35, 929.

33- BILLING B.H.- Bilirubin Metabolism.- Postgrad. Med. J., 1963, 39, 176.

34- BILLING B.H., COLE P.G., LATHE G.H.- Increased plasma bilirubin in newborn infant in relation to birth weight.- Brit. Med. J., 1954, 2, 1263.

35- BILLING B.H., COLE P.G., LATHE G.H.- Excretion of bilirubin as glucuronide giving direct Van den Bergh reaction.- Biochem. J., 1957, 65, 774.

36- BILLING B.H., GRAY C.H., KULCZYCKA A., MANFIELD P., NICHOLSON D.C.- The metabolism of C 14 bilirubin in congenital non haemolytic hyperbilirubinemia.- Clin. Sci., 1964, 27, 163.

37- BILLING B.H., LATHE G.H.- Bilirubin metabolism in jaundice.- Amer. J. Med., 1958, 24, 111.

38- BJURE J., LIDEN G., REINAND T., VESTBY A.- A follow up study of hyperbilirubinemia in full term infants without iso-immunization.- Acta Pediat. (Stock), 1961, 50, 437.

39- BLONDHEIM S.H.- The relationship between the albumin concentration of serum and its dye-binding capacity.- J. Lab. Clin. Med. 1955, 45, 740.

40- BOGGS T.R.- Exchange transfusion for hyperbilirubinemia in premature infants.- Pediatrics, 1959, 23, 814.

41- BOGGS T.R., ABELSON N.M.- Plasma pigments in erythroblastosis fetalis. II- The level of heme pigment : an early guide to management of erythroblastosis fetalis.- Pediatrics, 1956, 17, 461.

42- BOGGS T.R., HARDY J.B., FRAZIER T.M.- Correlation of neonatal serum total bilirubin concentrations and developmental status at age eight months.- J. Pediat. 1967, 71, 553.

43- BOGGS T.R., WESTPHAL M.C.- Mortality of exchange transfusions.- Pediatrics, 1960, 26, 745.

44- BOHUON C., LEBOEUF M.- Etude critique d'une méthode de dosage de l'albumine sérique par combinaison albumine-colorant.- Ann. Biol. Clin. (Paris), 1964, 22, 133.

45- BOISSIERE H., CAGNAT R.- Les ictères par hyperbilirubinémie indirecte du nouveau-né.- Méd. Infant. (Paris), 1966, 73, 809.

46- BONNET-GAJDOS M.- Données nouvelles sur la maladie hémolytique néonatale.- Méd. Infant. (Paris), 1966, 73, 319.

47- BOREAU T., DAVID G.- Les indications actuelles de l'exsanguino-transfusion chez le nouveau-né.- Presse Méd., 1957, 65, 715.

48- BOREAU T., DAVID G.- Résultats immédiats de l'exsanguino-transfusion dans le traitement de la maladie hémolytique du nouveau-né.- Sem. Hôp. Paris, 1958, 34, 386.

49- BOREAU T., GUIN A.M.- Les anémies au cours de la maladie hémolytique néonatale par incompatibilité foeto-maternelle.- Ann. Pédiat., 1964,40; 900/386.

50- BOREAU T., MARTIN L., LARROCHE J.C., SAUTRIOT G.- Etude clinique de quelques cas d'ictère nucléaire du nouveau-né par maladie hémolytique à évolution rapidement mortelle. Essai de classification.- Gynéc., Obst., 1964, 63, 289.

51- BOREAU T., MENSCH-DECHENE J., ROUX-DOUHERET F.- Etude clinique de 34 cas d'ictère nucléaire par maladie hémolytique néonatale et de leur

évolution.- Arch. Franç. Pédiat. 1964, 21, 43.

52- BOURRILLON R.- Isolement et propriétés du complexe bilirubine sérum-albumine du sérum.- Bull. Soc. Clin. Biol. (Paris), 1957, 39, 385.

53- BOWEN W.R., PORTER E., WATERS W.J.- The protective action of albumin in bilirubin toxicity in newborn puppies.- J. Dis. Child., 1959, 98, 568.

54- BRACKEN J.S., KLOTZ I.M.- A simple method for the rapid determination of serum-albumin.- Amer.J. Clin. Path., 1953, 23, 1055.

55- BROWN A.K.- Neonatal jaundice.- Pediat. Clin. N. Amer. 1962, 9, 575.

56- BROWN A.K.- Bilirubin metabolism and neonatal jaundice.- Advances Pediat., 1962, 12.

57- BROWN A.K.- Erythrocyte metabolism and hemolysis in the newborn.- Pediat. Clin. N. Amer. 1966, 13, 879.

58- BROWN A.K., ZUELZER W.W.- Studies in hyperbilirubinemia. I- Hyperbilirubinemia of the newborn unrelated to isoimmunization.- J. Dis. Child. 1957, 93, 263.

59- BROWN A.K., ZUELZER W.W.- Studies on neonatal development of the glucuronide conjugating system.- J. Clin. Invest. 1958, 37, 332.

60- BROWN A.K., ZUELZER W.W., ROBINSON A.R.- Studies on hyperbilirubinemia. II- Clearance of bilirubin from plasma and extravascular space in newborn infants during exchange transfusion.- J. Dis. Child., 1957, 93, 274.

61- BROWN R.J.K., WALLIS P.G.- Hypoglycemia in the newborn infant.- Lancet, 1963, 1, 1278.

62- BROWN W.R., GRODSKY G.M., CARBONE J.W.- Intracellular distribution of tritiated bilirubin during hepatic uptake and excretion.- Amer. J. Physiol., 1965, 207, 1237.

63- BYERS R.K., PAINE R.S., CROTHERS B.- Extrapyramidal cerebral palsy with hearing loss following erythroblastosis.- Pediatrics, 1955, 15, 248.

64- CARTER R.E., MAC GANN R.J.- The standardization of the Van den Bergh reaction for serum bilirubin.- Clin. Chem., 1959, 5, 106.

65- CATZ C., YAFFE S.J.- Pharmacological modifications of bilirubin conjugation in newborn.- Amer. J. Dis. Child., 1962, 104, 516.

66- CHARBONNIER A.- Etude critique du dosage de la bilirubine sérique.- Ann. Biol. Clin. (Paris), 1958, 16, 263.

67- CHEVREL B., CHEVREL J.P.- L'ictère néonatal lié à l'allaitement maternel (Breast milk jaundice).- Presse Méd., 199, 74, 1755.

68- CLAIREAUX A.E.- Hemolytic disease of the newborn. Part II : Nuclear jaundice (Kernicterus).- Arch. Dis. Child., 1950, 25, 61.

69- CLAIREAUX A.E., COLE C., LATHE G.- Icterus of the brain in the newborn.- Lancet, 1953, 2, 1226.

70- CLARKE L.A., FINN R., LEHANNE D., MAC CONNELL R. B., SHEPPARD P.M., WOODROW J.C.- Dose of anti D gammaglobulin in prevention of haematolytic disease of the newborn.- Brit. Med. J., 1966, 1, 213.

71- COLE P.G., LATHE G.H., BILLING B.H.- Separation of bile pigments of serum bile and urine.- Biochem. J., 1954, 57, 514.

72- COLIN J., POLONOVSKI C.- Explorations biologiques en pédiatrie. 1 vol., 1194 p.- Paris, 1963 - Expansion Scient. Franç., édit.-

73- Committee on fetus and newborn of the American Academy of Pediatrics. Recommandations on a uniform bilirubin standard.- Pediatrics, 1963, 31, 876.

74- COQUET M.- Les séquelles neurologiques tardives de l'ictère nucléaire.- Ann. Paediat. (Basel), 1944, 163, 88.

75- CORNER B.- Kernicterus and prematurity.- Amer. J. Dis. Child., 1955, 90, 520.

76- CORNER B.D.- Hyperbilirubinemia in premature infants treated by exchange transfusion.- Proc. Roy. Soc. Med., 1958, 51, 1019.

77- COSTA FERREIRA H.- Superiluminaçao na hyperbilirubinemia do recem nascido.- J. Pediat (Rio), 1960, 25, 4.

78- COWGER M.L.- The effect of albumin in reversing bilirubin toxicity in tissue culture.- Amer. J. Dis. Child., 1955, 90, 520.

78 bis- COWGER M.L., IGOR P., LABBE R.F.- The mechanism of bilirubin toxicity studied with purified respiratory enzymes and tissue culture system.- Biochemistry (Wash.), 1965, 4, 2763.

79- CREMER R., PERRYMAN P., RICHARDS D.- Influence of light on the hyperbilirubinemia of infants.-

Lancet, 1958, 1, 1094.

80- CRIGLER J.F., NAJJAR V.A.- Congenital familial non hemolytic jaundice with kernicterus.- Pediatrics, 1952, 10, 169.

81- CROSSE V.M., CORNEY G.- The use of adrenocorticotrophic hormone in neonatal jaundice in premature babies.- Proc. Roy. Soc. Med., 1961, 54, 737.

82- CROSSE V.M., MEYER T.C., GERRARD J.W.- Kernicterus and prematurity.- Arch. Dis. Child., 1955, 30, 501.

83- CROSSE M.V., WALLIS P.G., WALSH A.M.- Replacement transfusion as a mean of preventing kernicterus of prematurity.- Arch. Dis. Child., 1958, 33, 403.

84- DANN M., LEVINE S.Z., NEW E.W.- Long term follop up study of small premature infants.- Pediatrics, 1964, 33, 945.

85- DAVID G., BOREAU T., INGRAND F., MAIGRET P.- L'ictère de la maladie hémolytique du nouveau-né.- Rev. Int. Hépat., 1960, 10, 37.

86- DAY R.- Kernicterus. Further observations on the toxicity ot heme pigments.- Pediatrics, 1956, 17, 925.

87- DAY R.L.- Inhibition of brain respiration in vitro by bilirubin. Reversal of inhibition by various means.- Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1954, 85, 261.

88- DAY R.L.- Physiologic jaundice.- Pediat. Clin. N. Amer., 1961, 8, 539.

89- DAY R., HAINES M.S.- Intelligence quotients of children from erythroblastosis fetalis since the introductions of exchange transfusions.- Pediatrics, 1954, 13, 333.

90- DE DUVE C.- The lysosomes.- Scientific Amer., 1963, 208, 64.

91- DIAMOND I.- Kernicterus : revised concepts of pathogenesis and management.- Pediatrics, 1966, 38, 539.

92- DIAMOND I., SCHMID R.- Bilirubin encephalopathy. Experimental models in newborn and adult animals.- Proc. Amer. Soc. Clin. Invest. Atlantic City New. Jers., 1965, 3.

93- DIAMOND I., SCHMID R.- Experimental bilirubin encephalopathy. The mode of entry bilirubin-C14 into the central nervous system.- J. Clin. Invest., 1966, 45, 678.

94- DIAMOND L.K., ALLEN F.H.Jr., VANN D.D., POWERS J.R.- Erythroblastosis fetalis. Round table discussion.- Pediatrics, 1952, 10, 337.

95- DIAMOND L.K., DENTON R.L.- Treatment of erythroblastosis fetalis.- J.A.M.A., 1954, 128, 686.

96- DINE M.S.- Hyperbilirubinemia in the newborn premature infant (abstract).- Amer. J. Dis. Child. 1954, 88, 810.

97- DOLTER J.M.- Kernicterus. Neurological sequelae of erythroblastosis fetalis.- J. Pediat., 1945, 27, 327.

98- DONGRADI M.R.- Le métabolisme du galactose et ses perturbations chez l'enfant.- Thèse Paris,1966,

dactyl., 126 p.-

99- DUCAS P.- La prévention de l'ictère nucléaire du prématuré.- Rev. Prat. (Paris), 1967, 17, 605.

100- DUCCI H., WATSON C.J.- The quantitative determination of the serum bilirubin with special reference to the prompt reacting and the chloroform soluble types.- J. Lab. Clin. Med.,1945, 30, 293.

101- DUNDON S.- The prevention of kernicterus in the premature.- J. Irish Med. Ass. 1956, 38, 99.

102- ERNSTER L., HERLIN L., ZETTERSTROM R.- Experimental studies on the pathogenesis of kernicterus.- Pediatrics, 1957, 20, 647.

103- EVANS P.R., POLANI P.E.- The neurological sequelae of Rh sensitization.- Quart. J. Med.,1950, 19, 129.

104- FINN R., CLARK C.A., LEHANE D., MAC CONNELL R.B., SHEPPARD P.M.- Prevention of Rh Haemolytic disease.- Brit. Med. J., 1961, 2, 109.

105- FORFAR J.D., KEAY A.J., ELLIOTT W.D., CUMMING R.A.- Exchange transfusions in neonatal hyperbilirubinemia.- Lancet, 1958, 2, 1131.

106- FORSTER F.M., MAC CORMACK R.A.- Kernicterus unassociated with erythroblastosis fetalis.- J. Neuropath., 1944, 3, 379.

107- FREDA V.J., GORMAN J., POLLACK W.- Prevention of Rhesus haemolytic disease.- Lancet, 1965,2,690.

108- FURUHJELM U., NEVAN LINNA H.R., OSTERLUND K.- Early neonatal jaundice and hyperbilirubinemia

and their relation to ABO incompatibility.- Acta Paediat. Scand. 1967, 56, 477.

109- GABURRO D., VOLPATO S., GIAQUINTO M.- Ictère nucléaire du nouveau-né par défaut de la G-G-PD.- Ann. Pédiat., 1961, 37, 2485/373.

110- GAJDOS A.- Données récentes sur la biosynthèse normale et pathologique des pigments biliaires (I).- Presse Méd., 1966, 74, 2049.

111- GAJDOS A.- Données récentes sur la biosynthèse normale et pathologique des pigments biliaires (II).- Presse Méd., 1966, 74, 2155.

112- GELLIS S.- Uncomplicated hyperbilirubinemia of prematurity.- Note de l'éditeur.- Year Book of Pediatrics, 1961-63, 1 vol., 507 pages.

113- GERRARD J.- Kernicterus and prematurity.- Lancet, 1950, 2, 35.

114- GERRARD J.W.- Kernicterus in prematures.- Canad. Med. Ass. J., 1957, 77, 661.

115- GILLOT F.- Etiologie et prophylaxie de la prématurité.- Rev. Prat. (Paris), 1967, 17, 555.

116- GOLDFISCHER S., ARIAS I.M., ESSNER E., NOVIKOFF A.B.- Cytochemical and electromicroscopic studies of rat liver with reduced capacity to transport conjugated bilirubin.- J. Exp. Med., 1962, 115, 467.

117- GOSSET I.H.- A perspect icterometer for neonates.- Lancet, 1960, 1, 87.

118- GOVAN A.D.T., SCOTT J.M.- Kernicterus and prema-

turity.- Lancet, 1953, 1, 611.

119- GRODSKY G.M., CARBONE J.V.- J. Biol. Chem.,1957, 226, 449.

120- GRODSKY G.M., CONTOPOULOS A.N., FANSKA R., CARBONE J.V.- Distribution of bilirubin H3 in the fetal and maternal rat.- Amer. J. Physiol., 1963, 204, 837.

121- GUNN C.K.- Hereditary acholuric jaundice.- J. Hered., 1938, 29, 137.

122- HARRIS R.C., LUCEY J.F., MAC LEAN J.R.- Kernicterus in premature infants associated with low concentrations of bilirubin in the plasma.- Amer. J. Dis. Child., 1964, 108, 122.

123- HAWORTH J.C., FORD J.S.- The effect of early and late feeding and glucagon upon blood sugar and serum bilirubin levels in premature infants. - Arch. Dis. Child., 1963, 38, 328.

124- HEIMER C.B., CUTLER R., FREEDMAN A.M.- Neurological sequelae of premature birth. The relationship to prenatal and neonatal complications birth weight and sex.- Amer. J. Dis. Child., 1964, 108, 122.

125- HESS A.- Blood brain barrier and ground substance of central nervous system.- Arch. Neurol. Psych. (Chicago), 1955, 73, 360.

126- HOLMAN G.- Studies on physiologic hyperbilirubinemia of negro and white premature infants.- Pediatrics, 1959, 21, 1115.

127- HOLTON J.B., LATHE G.H.- Inhibitions of bilirubin conjugation in newborn serum and male

urine.- Clin. Sci., 1963, 25, 499.

128- HOTTINGER A.- Étude clinique sur l'ictère nucléaire du prématuré.- Ann. Pédiat., 1957, 33, 2915/497.

129- HSIA D.Y.Y.- Bilirubin metabolism. The causes of neonatal jaundice.- Pediat. Clin. N. Amer., 1965, 12, 713.

130- HSIA D.Y.Y., ALLEN F.H.Jr., DIAMOND L.K., GELLIS S.- Serum bilirubin levels in the newborn infant.- J. Pediat., 1953, 42, 277.

131- HSIA D.Y.Y., ALLEN F.H., GELLIS S.S., DIAMOND L.K.- Erythroblastosis fetalis. VIII- Studies of serum bilirubin in relations to kernicterus. - New. Engl. J. Med., 1952, 247, 668.

132- HSIA D.Y.Y., DWDBEN R.M., SHAW R., GROSSMAN A.- Inhibition of glucuronyl transferase by progestional agents from serum of pregnant women.- Nature, 1960, 187, 693.

133- HSIA D.Y.Y., HSIA H.H., GELLIS S.S.- A micromethod for serum bilirubin.- J. Lab. Clin. Med., 1952, 40, 610.

134- HSIA D.Y.Y., HSIA H.H., GOFSTEIN R.M., WINTER A., GELLIS S.S.- Determination of concentration of bilirubin in serum. I- Rapid micromethod employing photoelectric colorimeter. II- Rapid micromethod employing color standard.- Pediatrics, 1956, 18, 433.

135- HUGGINS C., JENSEN E.V., PLAYER M.A., HOSPELHORN V.D.- The binding of phenolsulfonephtalein by serum and by albumine isolated from serum in cancer.- Cancer, 1949, 9, 753.

136 - HYMAN C.B., KEASTER J., HANSON V., HARRIS I., SEDWICK R., WRIGHT A.R. - Relationship of neonatal bilirubinemia to neurologic residuals in 372 childrens followed at least 4 years.- J. Pediat., 1965, 67, 960 (abst.).

137 - ISRAELS L.G., SVDERMANN H.J., RITZMAN S.E.- Hyperbilirubinemia due to alternate path of bilirubin production.- Amer. J. Med. 1959, 27, 1963.

138 - ISRAELS L.G., SKANDENBERG T., ZUYDA H., ZINGG W., ZIPURSKY A.- Study of early labelled fraction of bile pigment effect of alternating erythro-poiesis on incorporation of 2 - C 14 glycine into haem and bilirubin.- Brit. J. Haematol. 1963, 9, 50.

139 - ISRAELS L.G., ZIPURSKY A.- A primary shunt hyperbilirubinemia.- Nature (London), 1962, 193, 73.

140 - JABLOWSKI W.J.- Risks associated with exchange transfusions.- New-Engl. J. Med., 1962, 266, 155.

141 - JAMES L.S.- Physiology of respiration in newborn infants and in the respiratory distress syndrom. - Pediatrics, 1959, 24, 1069.

142 - JENDRASSIK K.L., CLEGHORN R.H.- Photometrioche Bilirubinbestimmung.- Biochem. Ztschr., 1936, 289, 1.

143 - JENDRASSIK K.L., GROF P.- Vereinfachte photometrische Methode zur Bestimmung des Blutbilirubins.- Biochem. Z., 1938, 297, 8.

144 - JONES M.H., SANDS R., HYMAN C.B., KOCH F.P., STURGEON F.- Longitudinal study of the inci-

dence of central nervous system damage following erythroblastosis fetalis.- Pediatrics, 1954, 14, 346.

145- JOHNSON L.M.- The effect of certain substances on bilirubin levels and occurence of kernicterus in genetical by jaundice rats.- In Kernicterus, 1 vol. 1961, Sass Kortsak A., Toronto, edit.-

146- JOHNSON L., BOGGS T.R.- Comment on : Kernicterus: Revised concepts of pathogenesis and managements.- Pediatrics, 1966, 38, 539.

147- JOHNSON L., GARCIA M.L., FIGUERRDA E., SARMIENTO F.- Kernicterus in rats laching glucuronyl transferase. II- Factors which after bilirubin concentration and frequency of kernicterus.- Amer. J. Dis. Child. 1961, 101, 322.

148- JOHNSON R.B., SELL S.- Observations on blood cultures with exchange transfusion on the newborn infants.- Pediatrics, 1963, 32, 1097.

149- KAPLAN M., STRAUS P., BIJAOUI G., BENSADOUN M.- Maladie de Crigler et Najjar. Etude clinique et biologique d'une observation. Aspect du tissu hépatique au microscope électronique.- Ann. Pédiat., 1966, 40, 2315/583.

150- KEITEL H.G., MENDUKE H., SMITH T., FIORENTINO T.- Premature infant feeding. III- The serum bilirubin concentration in premature infants with immediate and delayed feeding of formulas of varying caloric concentration.- Pediat. Clin. N. Amer., 1965, 12, 347.

151- KITCHEN W.H., KRIEGER V.J., SMITH A.- Human albumin in exchange transfusion (A quantitative study of the influence of added human albumin

in bilirubin removal).- J. Pediat., 1960, 57, 876.

152- KLATSKIN G., BUNGARDS L.- Bilirubin protein linkages in serum and their relationship to the Van Bergh reaction.- J. Clin. Invest., 1956, 35, 567.

153- KOCH F., RIND H.- Beeinflussung des Blutsbilirubinspiegels bei Neugeborenen durch Albumingabe.- Klin. Wschr., 1962, 40, 1077.

154- KOCH C.A., JANES D.V., DINE M.S., WAGNER E.A.- Hyperbilirubinemia in premature infants.- J. Pediat., 1959, 55, 23.

155- KOTTGEN U., BRAUN E.- Frühgeburt und Kernikterus.- Z. Kinderheilk., 1955, 76, 454.

156- KUSTER F., KRINGS H.- Die Bedeutung des Bilirubins für die Pathogenese des Hirnschadens bei des Erythroblastosis Fetalis.- Z. Kinderheilk. 1950, 67, 503.

157- LATHE G.H.- The chemical pathology of bile pigments. I- The plasma bile pigments.- Biochem. Soc. Symposia, 1954, 12, 34.

158- LATHE G.H., RUTHVEN C.R.Jr.- Factors affecting the rate of coupling of bilirubin and conjugated bilirubin in the Van den Bergh reaction. - J. Clin. Path. (London), 1958, 11, 155.

159- LATHE G.H., WALKER M.- An enzyme defect in human neonatal jaundice and in Gunn's strain of jaundice rats.- Biochem. J., 1957, 67.

160- LATHE G.H., WALKER M.- Synthesis of bilirubin glucuronide in animal and human lives.-

Biochem. J., 1958, 70, 105.

161- LATHE G.H., WALKER M.- Inhibition of bilirubin conjugation in rat liver slices by human pregnancy and neonatal serum and steroïds.- Quart. J. Exp. Phys., 1958, 43, 257.

162- LAURANCE B.M., SMITH B.H.- The premature baby's diet.- Lancet, 1962, 1, 589.

163- LELONG M., ALAGILLE D., ODIEVRE M.- Les anémies hémolytiques du nouveau-né à l'exception des incompatibilités sanguines.- Nouv. Rev. Franç. Hém., 1964, 4, 110.

164- LESTER R., BEARMAN R.E., LUCEY J.F.- Transport of bilirubin C 14 accross monkey placenta.- Pediatrics, 1963, 32, 416.

165- LESTER R., HAMMAKER L., SCHMID R.- A new therapeutic approach to unconjugated hyperbilirubinemia.- Lancet, 1962, 2, 1257.

166- LESTRADET H., JOLY B., DONGRADI M.R.- Les galactosémies.- Congrès européen sur les Maladies nutritionnelles et métaboliques. Rein, Foie, 1966, 9, 89.

167- LILEY A.W.- The use of ammiocentesis and fetal transfusion in erythroblastosis fetalis.- Pediatrics, 1965, 35, 836.

168- LONDON I.M., WEST R., SHEMIN D., RITTENBERG D.- On origin of bile pigments in normal man.- J. Biol. Chem. 1950, 184, 351.

169- LUCEY J.F.- Hyperbilirubinemia of prematurity.- Pediatrics, 1960, 25, 690.

170- LUCEY J.F.- In : Kernicterus revised concepts of pathogenesis and management by DIAMOND I., Pediatrics, 1966, 38, 539.

171- LUCEY J.F., ARIAS I.M., MAC KAY R.J. Jr.- Transient familial neonatal hypérbilirubinemia.- Amer. J. Dis. Child., 1960, 100, 787.

172- LUCEY J.F., PHILIPPS G.L., UTTERBACK J.G., MAC-KAY R.J. Jr.- A difference in the incidence of hyperbilirubinemia among premature infants in two hospitals.- Pediatrics, 1963, 30, 3.

173- LUCEY J.F., RANDALL J.L., MURRAY J.J.- Is hypoglycemia an important complication in erythroblastosis fetalis ?- Amer. J. Dis. Child.1967, 114, 88.

174- LUCEY J.F., VALAES T., DOXIADIS S.A.- Serum-albumine reserve P.S.P. dye binding capacity in infants with kernicterus.- Pediatrics, 1967, 39, 876.

175- MAC KAY R.J. Jr.- Current status of use of exchange transfusion in newborn infants.- Pediatrics, 1964, 33, 763.

176- MALLOY H.T., EVELYN K.A.- The determination of bilirubin with the photoelectric colorimeter.- J. Biol. Chem., 1937, 119, 481.

177- MARION J., DAUDET M., FREIDEL M.- Données nouvelles servant à l'interprétation des ictères accompagnant les sténoses hypertrophiques du pylore.- Pediatrics, 1967, 22, 649.

178- MARTIN N.H.- Preparation and properties of sérum and plasma proteins. XXI- Interactions with bilirubin.- J. Amer. Chem. Soc., 1949, 71, 1230.

179- MARTIN J.W., SIEBENTHAL B.J.- Jaundiced due to hypertrophic pyloric stenosis.- J. Pediat., 1955, 47, 95.

180- MARTINEK R.G.- Evaluation of a dye-binding method for determination of serum-albumin.- Clin. Chem., 1965, 11, 441.

181- MATHER A.- Reliability of bilirubin determinations in icterus of the newborn infant.- Pediatrics, 1960, 26, 350.

182- MELICHAR V., POLACEK K., NOVAK M.- The relationship between bilirubin concentration and the level of non esterified fatty acids in the blood of the newborn infants.- Biol. Neonat., 1962, 4, 94.

183- MEYER T.C.- A study of serum bilirubin levels in relation to kernicterus and prematurity.- Arch. Dis. Child., 1956, 31, 75.

184- MICHAELSSON M., NOSSLIN B., SJÖLINS - Plasma bilirubin determination in the newborn infant. A methodological study with special references to the influence of hemolysis.- Pediatrics, 1965, 35, 925.

185- MILLER H.C., REED H.R.- The relation of serum concentration of bilirubin to respiratory function of premature infants.- Pediatrics, 1958, 21, 362.

186- MOENS R.S.- Le métabolisme de la bilirubine.- Presse Méd., 1965, 73, 2049.

187- MOLLISON P.L.- Physiological jaundice of the newborn.- Lancet, 1948, 1, 513.

188- MOLLISON P.L., CUTBUSH M.- Hemolytic disease of the newborn. Criteria of severity.- Brit. Med. J., 1949, 1, 123.

189- MOLLISON P.L., CUTBUSH M.- A method of measuring the severity of a series of cases of hemolytic disease of the newborn.- Blood, 1951, 6, 777.

190- MORALES-MALVA J.A., SAPAG-HAGAR M., ISRAEL-BUDNICK S.- A preparatory paper electrophoto-resis method for the study of the transporting capacity of serum proteins.- Clin. Chim. Acta, 1966, 14, 667.

191- MORES A., FARGASOVA I., MINARIKOVA E.- The relation of hyperbilirubinemia in newborns without isoimmunization to kernicterus.- Acta Pediat., 1959, 48, 590.

192- NAJEAN Y.- Les mécanismes de l'hémolyse.- Méd. Infant. (Paris), 1966, 73, 287.

193- NAJJAR V.A.- The metabolism of carbohydrates, fats and bile pigments by the liver and the alterations in hepatic disease ; a review of recent advances.- Pediatrics, 1955, 15, 444.

194- NAKAJIMA H.- Studies on heme-α-methyloxygenase. II- Isolation and characterisation of final reaction product, possible precursor of bili-rubin.- J. Biol. Chem., 1963, 238, 3797.

195- NAKAJIMA H., TAKEMURA T., NAKAJIMA S., YAMAOKA K.- Studies on heme-α-methenyloxygenase. I- Enzymatic conversion of pyridin-hemichro-mogene and hemoglobin haptoglobin into possi-ble precursor of bilirubin.- J. Biol. Chem., 1963, 238, 3784.

196- NARSALA M., GAWRONSKA E., HSIA D.Y.Y.- Studies on the relation between serum and spinal fluid bilirubin during early infancy.- J. Clin. Invest., 1958, 37, 1403.

197- NATZSCHKA J.C., ODELL G.B.- The influence of bilirubin on the distribution and excretion of bilirubin in jaundiced rats.- Pediatrics, 1966, 37, 51.

198- NEIMANN N., PIERSON M.- L'ictère nucléaire.- Rapport au XVIIe Congrès de l'Association des Pédiatres de Langue française, Montpellier, 1959 - R. Int. Hépat., 1960, 10, 259.

199- NELIGAN G.A., ROBSON E., WATSON J.- Hypoglycemia in the newborn, a sequel of intrauterin malnutrition.- Lancet, 1963, 1, 1282.

200- NEWNS G.H., NORTON K.R.- Hyperbilirubinemia in prematurity.- Lancet, 1958, 2, 1138.

201- NIALL M.M., OWEN J.A.- Heparine as a source of error in the determination of plasma albumin on a basis selective dye binding.- Clin. Chem. Acta, 1962, 7, 155.

202- NOVAK M., POLACEK K., MELICHAR V.- Competition between bilirubin and non esterified fatty acids for binding bilirubin.- Biol. Neonat., 1962, 4, 310.

203- NUYTS J.P., BOUVIER C., BOMBART E., VANHEUVERSWYN C.- Ictère nucléaire au cours d'une maladie de Minkowski-Chauffard.- Pédiatrie, 1967, 22, 77.

204- OBRINSKI W., ALLEN E.L., ANDERSON E.E.- Physiologic hyperbilirubinemia in the newborn prema-

ture infant.- Amer. J. Dis. Child., 1954, 88, 810.

205- ODELL G.B.- In vitro studies of the effects of sulfonamides on bilirubin.- J. Dis. Child., 1958, 96, 535.

206- ODELL G.B.- Studies in kernicterus. I- The protein binding of bilirubin.- J. Clin. Invest., 1959, 38, 823.

207- ODELL G.B.- The dissociation of bilirubin from albumin and its clinical implications.- J. Pediat., 1959, 55, 268.

208- ODELL G.B.- The influence of pH on the distribution of bilirubin between albumin and mitochondria.- Proc. Soc. Paed. Res., 1964, Seattle, Wash.-

209- ODELL G.D.- In : Kernicterus : Revised concepts of pathogenesis and management.- By DIAMOND I., Pediatrics, 1966, 38, 539.

210- ODELL G.B., COHEN S.- The effect of pH on the protein binding of bilirubin.- Amer. J. Dis. Child., 1960, 100, 525.

211- ODELL G.B., BRYAN W.B., RICHMOND M.D.- Exchange transfusion.- Pediat. Clin. N. Amer., 1962, 9, 605.

212- ODELL G.B., COHEN S.N., GORDES E.H.- Administration of albumin in the management of hyperbilirubinemia by exchange transfusions.- Pediatrics, 1962, 30, 613.

213- ODELL G.B., NATZSCHKA J.C., STOREY B.- Bilirubin in the liver and kidney in jaundiced rats.- Amer. J. Dis. Child., 1966, 112, 351.

214- D'HAGEN J.F.- Human serum bilirubin.- Clin.Chem., 1957, 3, 609.

215- OSTROW J.D., SCHMID R.- The protein binding of C 14 bilirubin in human and mesure serum.- J. Clin. Invest., 1963, 42, 1286.

215 bis- OSTROW J.D., JANDL J.H., SCHMID R.- Formations of bilirubin from hemoglobin in vivo.- J. Clin. Invest., 1962, 41, 1628.

216- PERLSTEIN M.- Neurologic sequelae of erythroblastosis fetalis.- Amer. J. Dis. Child., 1950, 79, 605.

217- PETERSON R.E., SCHMID R.- Clinical syndrom associated with defect in steroïd glucuronide formation.- J. Clin. Endocr., 1957, 17, 1485.

218- PORTER E.G., WATERS W.J.- A rapid micromethod for measuring the reserve albumin binding capacity in serum from newborn infants with hyperbilirubinemia.- J. Lab. Clin. Med., 1966, 67 560.

219- POVEY M.J.C.- PH changes during exchange transfusion.- Lancet, 1964, 2, 339.

220- RAPNUND G., BOWMAN J., HARRIS R.- Bilirubinemia in non erythroblastic premature infants.- J. Dis. Child., 1960, 99, 604.

221- RAVINA J.H.- Vers une prévention de l'iso-immunisation Rhesus.- Presse Méd., 1966, 74, 2417.

222- ROBINSON S.H., OWEN C.A. Jr., FLOCKE, SCHMID R.- Bilirubin formation in the liver from non hemoglobin sources.- Blood, 1965, 26, 823.

223- ROSSIER A., ALISON F.- Le syndrome de stase pyloro-duodénale des premiers jours chez le prématuré.- Méd. Infant. (Paris), 1959, 66, 13.

224- ROSSIER A., CALDERA R., DAOUD Mme, PIZZO P.- Ictère et prématurité. I- L'ictère néonatal par immaturité.- Ann. Péd., 1966, 42, 355/107.

225- ROZDILSKY B.- Kittens as experimental models for study of kernicterus.- Amer. J. Dis. Child., 1966, 111, 161.

226- ROZDILSKY B., DLSZEWSKI J.- Permeability of cerebral vessels to albumin in hyperbilirubinemia.- Neurology (Minneapolis), 1960, 10, 631.

227- RUTSTEIN D.D., INGENITO E.F., REYNOLDS W.E.- The determination of albumin in human blood plasma and serum. A method based on the interaction of albumin with anionic dye 2-(4' hydroxy-benzeneazo) benzoïc acid.- J. Clin. Invest., 1954, 33, 211.

228- RUYS J.H., VAN GELDEREN H.H.- Administration of albumin in exchange transfusion.- J. Pediat., 1962, 61, 413.

229- SACREZ R., FRUHLING L., HEUMANN G.- Ictère nucléaire du prématuré exempt d'érythroblastose.- Pédiatrie, 1952, 41, 731.

230- SARRUT S., NEZELOF C.- La maturation hépatique ; ses aspects histologiques.- Rev. Int. Hépat., 1959, 9, 425.

231- SCHALM L.- Recherches sur la physiologie de la bilirubine.- Rev. Int. Hépat., 1962, 12, 559.

232- SCHENKER S., DAWBER N.H., SCHMID R.- Bilirubin metabolism in fetus.- J. Clin. Invest., 1964, 43, 32.

233- SCHENKER S., MAC CANDLESS D.W., ZOLLMAN P.E.- Studies of cellular toxicity of unconjugated bilirubin in kernicterus brain.- J. Clin. Invest., 1966, 45, 1213.

234- SCHMID R.- Direct reacting bilirubin, bilirubin glucuronide in serum, bile and urine.- Science, 1956, 124, 76.

235- SCHMID R.- Identification of "direct reacting" bilirubin as bilirubin glucuronide.- J. Biol. Chem., 1957, 229, 881.

236- SCHMID R., HAMMAKER L.- Glucuronide formation in patients with constitutional hepatic dysfunction (Gilbert's disease).- New Engl. J. Med., 1959, 260, 1310.

237- SCHMID R., HAMMAKER L.- Metabolism and disposition of C 14 bilirubin in congenital non hemolytic jaundice.- J. Clin. Invest., 1963, 42, 1720.

238- SCHMID R., HAMMAKER L., AXELROD J.- The enzymatic formation of bilirubin glucuronide.- Arch. Biochem., 1957, 70, 285.

239- SCHMID R., AXELROD J., HAMMAKER L., SWARM R.L.- Congenital jaundice in rats due to defect of glucuronide formation.- J. Clin. Invest.,1958, 37, 1123.

240- SCHMID R., DIAMOND I., HAMMAKER L., GUNDERSEN C. B.- Interaction of bilirubin with albumin.- Nature (London), 1965, 206, 1041.

241- SCHNEEGANS E., HEUMAN G., GEISERT J.- Valeur de l'irradiation lumineuse de la peau dans l'hyperbilirubinémie du prématuré et du nouveau-né.- Arch. Franç. Pédiat., 1964, 21, 877.

242- SENDRAIL A., BIERME R., BIERME S., CABANNES R.- Etude de la bilirubinogenèse chez des nouveau-nés atteints de maladie hémolytique néonatale.- Arch. Franç. Pédiat., 1966, 23, 653.

243- SHILLER J.G., SILVERMAN W.A.- The lack of association between hyperbilirubinemia and brain drainage of prematurity.- Amer. J. Dis. Child., 1960, 100, 496.

244- SHILLER J.G., SILVERMAN W.A.- Uncomplicated hyperbilirubinemia of prematurity. Lock of association with neurological defects at 3 years of age.- Amer. J. Dis. Child., 1961, 101, 79.

245- SILVERMAN W.A.- The fate at age 2 years of premature infants treated with penicillin and sulfisoxazole during the first five days of live.- J. Dis. Child., 1958, 96, 913.

246- SILVERMAN W.A., ANDERSEN D.H., BLANC W.A., CROZIER D.N.- A différence in mortality rate and incidence of kernicterus among premature infants alloted to too prophylactic antibacterial regimens.- Pediatrics, 1956, 18, 614.

247- SIMON G., VARONIER H.S.- Etude au microscope électronique du foie de deux cas d'ictère non hémolytique congénital de type Gilbert.- Schweiz. Med. Wschr., 1963, 93, 459.

248- SINGLETON J.W., LESTER L.- Biliverdin reductase in guinea pig liver.- J. Biol. Chem., 1965, 240, 4780.

249- SMALLPEICE V., DAVIES P.A.- Immediate feeding of premature infants with undiluted breast-milk.- Lancet, 1964, 2, 1349.

250- SMALLPEICE V., DAVIES P.A.- The immediate feeding of babies weighing 1000-2000 gm with breast-milk.- Proc. Roy. Soc. Med., 1964, 57, 1173.

251- STEMPFEL R., ZETTERSTROM R.- Concentration of bilirubin in cerebrospinal fluid on hemolytic disease of the newborn.- Pediatrics, 1965, 16, 184.

252- STERN L., DENTON R.L.- Kernicterus in small premature infants.- Pediatrics, 1965, 35, 483.

253- STIEHM E.R., RYAN J.- Breast milk jaundice.- Amer. J. Dis. Child., 1965, 109, 212.

254- SUTHERLAND J.M., KELLER W.H.- Novobiocin and neonatal hyperbilirubinemia.- Amer. J. Dis. Child., 1961, 101, 447.

255- THEILE H., STEINIGER U., BEYREISS K.- Tierexperimentelle und klinische Untersuchungen zur Wirkung intravenöser Albuminzufuhr bei Hyperbilirubinemiae.- Z. Kinderheilk, 1963, 88, 144.

256- TISDALE W.A., KLATSKIN G., KINDELLA E.D.- The significance of the direct reacting fraction of serum bilirubin in hemolytic jaundice.- Amer. J. Med., 1959, 26, 214.

257- TROLLE D.- Discussion on the advisability of performing exchange transfusion in neonatal jaundice of unknown etiology.- Arch. Dis. Child., 1964, 39, 85.

258- TROLLE D.- Incidence and possible relation to athetosis of neonatal jaundice of unknown etiology.- Arch. Dis. Child., 1964, 39, 85.

259- TUTLE A.H.- Serum pigment studies in newborn infants. I- Erythroblastosis fetalis.- Amer. J. Dis. Child., 1955, 39, 544.

260- ULSTROM R.A., EISENKLAME - The enterohepatic shunting of bilirubin in the newborn infant. I use of oral activated charcoal to reduce normal serum bilirubin values.- J. Pediat., 1964, 65, 27.

261- VAN PRAAGH R.- Diagnosis kernicterus in the neonatal period.- Pediatrics, 1961, 28, 870.

262- VAUGHAN V.C.- Kernicterus in erythroblastosis fetalis.- J. Pediat., 1946, 29, 452.

263- VAUGHAN V.C., ALLEN F.H.Jr., DIAMOND L.L.- Erythroblastosis fetalis. IV- Further observations on kernicterus.- Pediatrics, 1950, 6, 706.

264- VEST M.- Insufficient glucuronide formation in the newborn and its relationship to the pathogenesis of icterus neonatorum.- Arch. Dis. Child., 1958, 33, 473.

265- VEST M.F., GRIEDER H.R.- Erythrocyte survival in the newborn infants as measured by Cr 51 and its relation to the post natal serum bilirubin level.- J. Pediat., 1961, 59, 194.

266- VON VEST M.- Austauchtransfusionen zur Verhütung von Kernikterus bei der Hyperbilirubinämie der Frühgeburten und Neugeborenen.- Schweiz. Med. Wschr., 1958, 88, 208.

266 bis- WATERS W.J.- The reserve albumin-binding capacity as[a] interim for exchange transfusion.- J. Pediat., 1967, 70, 185.

267- WATERS W.J., BOWEN W.- Bilirubin encephalopathy.- Amer. J. Dis. Child., 1955, 90, 603.

268- WATERS W.J., PORTER E.G.- Dye-binding capacity of serum albumin in hemolytic disease of the newborn.- Amer. J. Dis. Child., 1961, 102,807.

269- WATERS W.J., PORTER E.G.- Indications for exchange transfusion based upon the role of albumin in the treatment of hemolytic disease of the newborn.- Pediatrics, 1964, 33, 749.

270- WATERS W.J., PORTER E.G.- The reserve albumin binding capacity as a criterion for exchange transfusion.- J. Pediat., 1965, 67, 1042.

271- WATERS W.J., RICHERT D.A., RAWSON H.H.- Bilirubin encephalopathy.- Pediatrics, 1954, 13, 319.

272- WATSON D.- The transport of bile pigments : the bindings of sodium bilirubinate plasma proteins.- Clin. Sci., 1962, 22, 435.

273- WEBER A.P., SCHALM L.- Quantitative separation and determination of bilirubin and conjugated bilirubin.- Clin. Chem. Acta, 1962, 7, 805.

274- WEISBROOT I.M., JAMES L.S., PRINCE C.E., HOLADAY D.A., APGAR V.- Acid-base homeostasis of the newborn infants during the first 24 hours of life.- J. Pediat., 1956, 52, 395.

275- WENNBERG R.P., SCHWARTZ R., SWEET A.Y.- Early verus delayed feeding of low birth weight

infants. Effects on physiologic jaundice.- J. Pediat., 1966, 68, 860.

276- WESTPHAL M., VIERGIVER E., ROTH R.- Analysis of bilirubin survey.- Pediatrics, 1962, 30, 12.

277- WHITE F.D., DUNCAN D.- Photometric studies on the diazo reaction for serum bilirubin.- Canad. J. Med. Sc., 1952, 30, 522.

278- WHITE D., HADAR H., RHEINHOLD J.- Spectrophotometric measurement of bilirubin concentration in the serum by the use of a micro capillary method.- Clin. Chem., 1958, 4, 211.

279- WISHINGRAD L., ELEGANT L.D.- Multiple replacement transfusions in two infants with Rh erythroblastosis.- Pediatrics, 1961, 28, 331.

280- WISHINGRAD L., CORNBLATH M., TAKAKUMA T., ROSENFELD I.M., ELEGANT L.D., KAUFMAN A., LASSERS E., KLEIN R.I.- Studies of non hemolytic hyperbilirubinemia in premature infants. I- Perspective randomized selection for exchange transfusion with observations on the level of serum bilirubin with and without exchange transfusion and neurologic evaluations one year after birth.- Pediatrics, 1965, 36, 102.

281- WOOD B.S.B., CULLEY P.E., WATERHOUSE J.A.H., POWELL J.D.- Factors influencing neonatal jaundice.- Arch. Dis. Child., 1962, 37, 371.

282- WRANNE L.- Congenital non hemolytic jaundice.- Acta Pediat. Scand., 1967, 56, 552.

283- WRENN H.T., FEICHTMEIR T.V.- The quantitative of albumin based in its dye-binding capacity.-

Amer. J. Clin. Path., 1956, 26, 960.

284- YAFFE S.J., LEVY G.L., MATSUZAWA T., BALIAH T.- Enhancement of glucuronide-conjugating capacity in a hyperbilirubinemic infant due to apparent enzyme induction by phenobarbital.- New Engl. J. Med., 1966, 275, 1461.

285- YATMAMOTO T., SKANDENBERG J., ZIPURSKY A., ISRAELS L.G.- The early appearing bilirubin evidence for two components.- J. Clin. Invest. 1965, 44, 31.

286- YU W.L., ALDRICH R.A.- The glucuronyl transferase system in the newborn infant.- Pediat. N. Amer., 1960, 7, 381.

287- ZETTERSTROM R., ERNSTER L.- Bilirubin anuncoupler of oxydative phosphorylation in isolated mitochondria.- Nature (London), 1956, 178, 1335.

288- ZIEVE L., HILL E., HANSON M., FALCONE A.B., WATSON C.J.- Normal and abnormal variations and clinical significance of the one minute and total serum bilirubin determinations.- J. Lab. Clin. Med., 1951, 38, 446.

289- ZINKHAM W.H.- An in vitro abnormality of glutathione metabolism in erythrocytes from normal newborn. Mechanisms and clinical significance.- Pediatrics, 1959, 23, 18.

290- ZUELZER W.W., BROWN A.K.- Neonatal jaundice. A review.- Amer. J. Dis. Child., 1961, 107, 87.

291- ZUELZER W.W., MUDGETT R.T.- Kernicterus : Etiologic study based of an analysis of 55 cases.- Pediatrics, 1950, 6, 452.